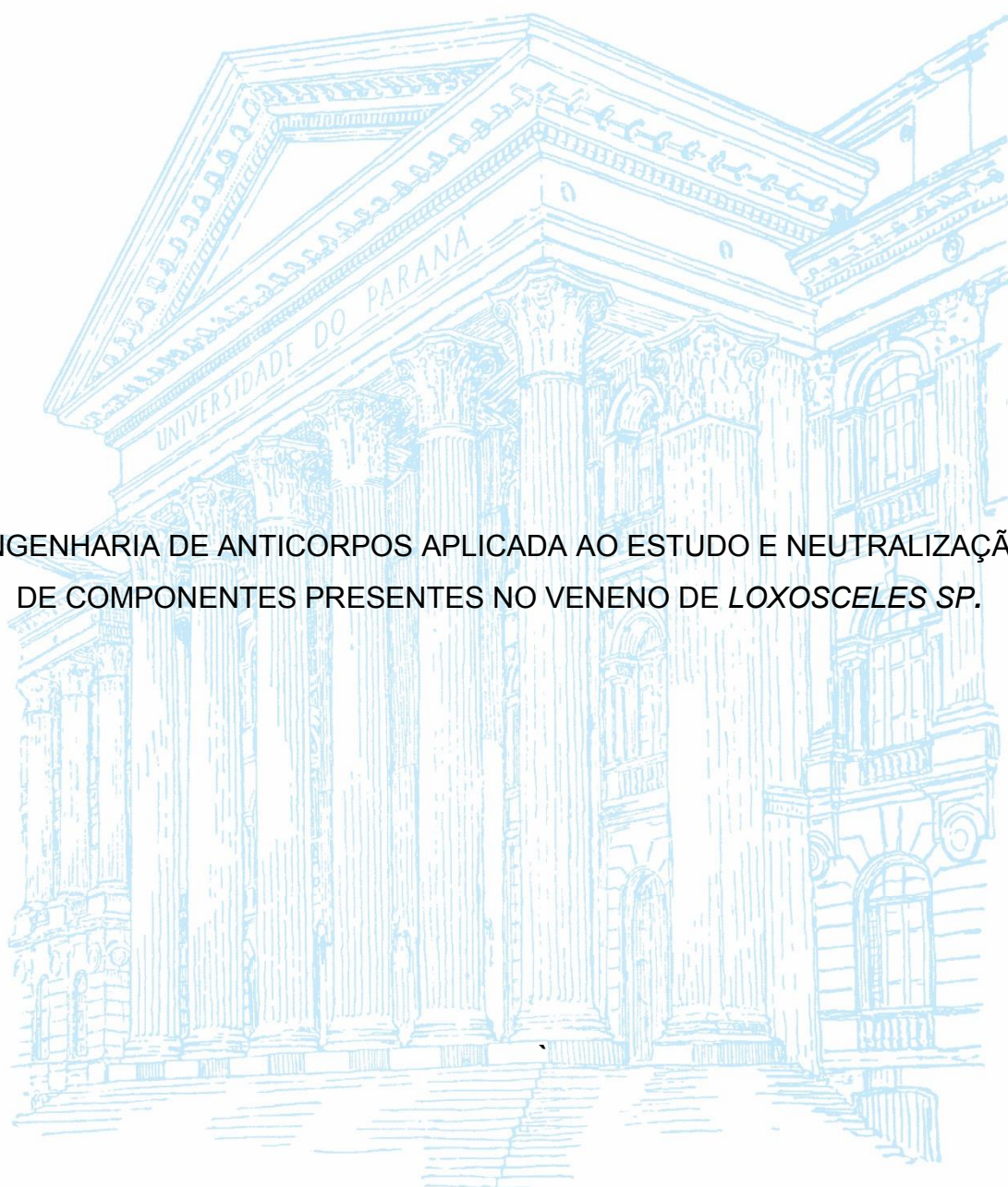


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA ALVES MONDINI

ENGENHARIA DE ANTICORPOS APLICADA AO ESTUDO E NEUTRALIZAÇÃO
DE COMPONENTES PRESENTES NO VENENO DE *LOXOSCELES SP.*



CURITIBA

2018

CAMILA ALVES MONDINI

ENGENHARIA DE ANTICORPOS APLICADA AO ESTUDO E NEUTRALIZAÇÃO
DE COMPONENTES PRESENTES NO VENENO DE *LOXOSCELES SP.*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof.^a(a). Dr^(a). Larissa Magalhães Alvarenga

Coorientador(A): Prof.^a(A). Dr^(a). Alessandra Becker Finco e Prof.^a(A). Dr(A). Juliana Ferreira de Moura.

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

M741e

Mondini, Camila Alves

Engenharia de anticorpos aplicada ao estudo e neutralização de componentes presentes no veneno de *Loxosceles* sp / Camila Alves Mondini. – Curitiba, 2018.
77 p. : il. color.

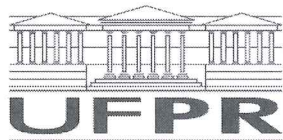
Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018.

Orientadora: Larissa Magalhães Alvarenga.

Coorientadoras: Alessandra Becker Finco, Juliana Ferreira de Moura.

1. *Loxosceles*. 2. Anticorpo monoclonal. 3. Fragmento de anticorpo recombinante. 4. Notina.
5. Esfingomielinase. I. Universidade Federal do Paraná. II. Alvarenga, Larissa Magalhães.
III. Finco, Alessandra Becker. IV. Moura, Juliana Ferreira de. V. Título.

CDD: 532



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAMILA ALVES MONDINI** intitulada: **ENGENHARIA DE ANTICORPOS APLICADA AO ESTUDO E NEUTRALIZAÇÃO DE COMPONENTES PRESENTES NO VENENO DE LOXOSCELES SP.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Março de 2018.

JULIANA FERREIRA DE MOURA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

TÁRCIO TEODORO BRAGA
Avaliador Externo (UFPR)

RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA
Avaliador Externo (UNESC)

RESUMO

No Brasil, o gênero *Loxosceles* é responsável por causar acidentes em humanos, predominantemente as espécies *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles laeta*. Os acidentes ocorrem com maior frequência durante as épocas mais quentes do ano. Em 2015 foram registrados 7.370 casos no Brasil, o que torna o envenenamento por aranhas *Loxosceles* um sério problema de saúde no país. O conhecimento do conteúdo completo do veneno de *Loxosceles* ainda está sob investigação. No entanto, sabe-se que sua composição bioquímica é uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos, principalmente proteínas e peptídeos com ação tóxica e/ou enzimática. As notinas são as proteínas mais abundantes no veneno, sendo componentes fundamentais nos mecanismos de captura de presas para alimentação. Sabe-se que são encarregadas de paralisar presas, em especial insetos. No entanto seu papel em organismos humanos ainda não está elucidado. Visto que as notinas representam uma grande porcentagem da composição do veneno, torna-se imprescindível o entendimento da sua função no envenenamento. Na maioria das espécies de *Loxosceles* prevalece as toxinas que diretamente desencadeiam os principais sinais e sintomas decorrentes da picada deste aracnídeo. Também conhecidas como toxinas dermonecroticas, as fosfolipases-D causam os principais efeitos nocivos atribuídos ao veneno total, tendo destaque a dermonecrose, edema e hemólise. Loxoscelismo descreve a condição comumente manifestada após acidentes com aranhas marrons. O diagnóstico é geralmente definido com base na evolução do quadro clínico do paciente e aspectos epidemiológicos. Entretanto, há outras patologias que podem causar o desenvolvimento de lesão dermonecrotica; sendo assim, a confirmação do diagnóstico auxilia no empregado do tratamento apropriado. A soroterapia é o único tratamento específico, porém efeitos adversos são um problema iminente. Dessa forma se torna necessário a obtenção de uma ferramenta capaz de detectar e neutralizar componentes do veneno. Anticorpos são bons candidatos por poderem ser selecionados de acordo com sua reatividade para uma proteína específica. À vista disso, neste projeto, realizou-se a produção e caracterização de um anticorpo monoclonal murino – mAb12 – e seus fragmentos recombinantes – scFv12P e diabody12P. O mAb12 assim como os fragmentos recombinantes foram capazes de reconhecer componentes presentes nos venenos das aranhas *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, apresentando reatividade as proteínas de baixa massa (5-10kDa). Na literatura há descrito dois anticorpos monoclonais direcionados as fosfolipases dos venenos loxoscélicos: LimAb7 e Lid1mAb16, sendo assim um alvo diferente ao do mAb12. Também foi verificado o potencial protetor do mAb12 através de ensaios de hemólise *in vitro*, sendo observado inibição da hemólise com 320 pmol do anticorpo. Tal comportamento pode ser possivelmente devido a reação cruzada com as esfingomielinases ou sinergismo entre alvo antigênico e toxinas dermonecroticas. Em *ELISA* de competição, o scFv12P foi capaz de detectar pequenas concentrações do veneno em solução, possuindo potencial aplicação como ferramenta de identificação dos três venenos. Com base nas análises de imunoprecipitação e espectrometria de massa foi sugerido o alvo antigênico, uma notina que possui 100% de identidade entre as espécies de *L. intermedia* e *L. gaucho* e alta similaridade (>80%) com *L. laeta*. O estudo da função dessa classe de proteína no organismo humano auxiliaria a possível identificação da sua atividade no envenenamento.

Palavras-chave: *Loxosceles*, anticorpo monoclonal, fragmento de anticorpo recombinante, notina, reação cruzada, sinergismo, esfingomielinase.

ABSTRACT

In Brazil, the *Loxosceles* genus of arachnid is responsible for numerous cases of significant harm to humans. The *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles gaucho* and *Loxosceles laeta* species are most hazardous. Spider bites occur more frequently during the hottest times of the year. In 2015 7,370 cases were registered in Brazil, making spider poisoning a serious health concern for the country. The exact content of *Loxosceles* venom is still being investigated. However, its biochemical composition is known to be a complex mixture of biologically active compounds, mainly proteins and peptides with toxic and/or enzymatic action. Notines are the most abundant proteins in the venom and are fundamental components in the mechanisms of capture of prey for feeding. They paralyse prey in certain insects. However, its effect on human organisms is unknown. Since they represent a large percentage of the composition of the poison, it becomes essential to understand its role in poisoning. Toxins that trigger the main signs and symptoms resulting from this arachnid bite are prevalent in most *Loxosceles* species. Phospholipases-D, also known as dermonecrotic toxins, cause the most severe effects attributed to the venom, such as dermonecrosis, edema and hemolysis. Loxoscelism describes the condition commonly manifested after a brown spider bite. The diagnosis is based on the evolution of the patient's clinical and epidemiological conditions. However, other pathologies can cause the development of a dermonecrotic lesion; so, a confirmation of the diagnosis enables appropriate treatment. Serum therapy is the only specific treatment and there are various adverse effects. In this way, it becomes necessary to obtain a tool capable of detecting and neutralising components of the venom. Antibodies are good candidates because they can be selected for a specific protein. Therefore, in this project, a production and characterisation of a murine monoclonal antibody - mAb12 - and its recombinant fragments - scFv12P and diabody12P is performed. mAb12 as well its recombinant fragments were able to recognize components present *L. intermedia*, *L. gaucho* and *L. laeta* spider venoms, presenting reactivity to low-mass proteins (5-10kDa). In the literature, two monoclonal antibodies directed to phospholipases of *Loxosceles* venoms have been described: LimAb7 and Lid1mAb16, thus being a different target than mAb12. The protective potential of mAb12 has also been verified by in vitro hemolysis assay, with inhibition of haemolysis observed with 320 pmol/mL of antibody. Such behaviour may possibly be due to cross-reacting with the sphingomyelinases or synergism between antigenic target and dermonecrotic toxins. In competitive ELISA, scFv12P was able to detect small concentrations of venom in solution, presenting its potential application as a tool of venom identification, with potential application as a tool to identify the three venoms. Based on the analysis of immunoprecipitation and mass spectrometry, the antigenic target suggested was a notine that has 100% identity between *L. intermedia* and *L. gaucho* species and high similarity (> 80%) to *L. laeta*. The study of this protein class function in the human organism would help the possible identification of its activity in the poisoning.

Key-words: *Loxosceles*, monoclonal antibody, recombinant antibody fragment, notine, cross-reaction, synergism, sphingomyelinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia da aranha do gênero <i>Loxosceles</i> .	15
Figura 2: Distribuição geográfica das três espécies mais importantes do gênero <i>Loxosceles</i> no território brasileiro.	16
Figura 3: Fosfolipases-D (PLD).	19
Figura 4: Motivo nó inibidor de cisteína (ICK).	20
Figura 5: Reação local a picada de aranha-marrom.	22
Figura 6: A estrutura de uma molécula de anticorpo.	27
Figura 7: Modificações estruturais na molécula de anticorpo.	29
Figura 8: Principais etapas desenvolvidas no presente estudo.	31
Figura 9: Ilustração esquemática da construção do diabody12P.	44
Figura 10: Reatividade do mAb12 frente aos venenos loxoscélicos.	50
Figura 11: Perfil eletroforético da reatividade do mAb12P frente aos venenos loxoscélicos.	51
Figura 12: Porcentagem de inibição da hemólise de veneno <i>L. intermedia</i> pelo mAb12.	53
Figura 13: Perfil eletroforético da proteína purificada em coluna de mAb12.	54
Figura 14: Fração variável do anticorpo monoclonal – mAb12.	57
Figura 15: Fragmento recombinante diabody12P.	58
Figura 16: Análise da expressão e purificação dos fragmentos recombinantes scFv12P (A) e diabody12P (B).	60
Figura 17: Comparação da reatividade entre os fragmentos recombinantes frente cada veneno de <i>Loxosceles sp.</i>	62
Figura 18: Análise por <i>Western blot</i> do scFv12P (A) e diabody12P (B) frente aos venenos.	64
Figura 19: Competição entre veneno em solução e imobilizado.	65
Figura 20: Sequência dos peptídeos de 15 aminoácidos sintetizados pela técnica de <i>Spot synthesis</i> .	66
Figura 21: Reatividade dos peptídeos derivados da estrutura primária da notina LiTx1 testado com mAb12.	67
Figura 22: Reatividade dos peptídeos derivados da estrutura primária de três fosfolipases testado com mAb12.	68

Figura 23: Alinhamento das estruturas primárias de três fosfolipases e três notinas, análise intra e interespecies de <i>Loxosceles</i>	69
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros do instrumento <i>LTQ Orbitrap XL ETD</i>	37
Tabela 2: Parâmetros de pesquisa do software PEAKS.	37
Tabela 3: Reação de transcrição reversa.....	38
Tabela 4: Reação de PCR para amplificação da região hipervariável de cadeia pesada e leve.	39
Tabela 5: Reação de sequenciamento.....	41
Tabela 6: Reação de PCR convencional.....	42
Tabela 7: Reação de Digestão.	43
Tabela 8: Reação de Ligação.....	43
Tabela 9: Sequência de aminoácidos das proteínas sintetizadas em membrana de celulose.	49
Tabela 10: Resumo dos critérios utilizados para seleção da proteína identificada por espectrometria de massa.	55
Tabela 11: Sequência dos peptídeos identificados e proteína selecionada a partir dos peptídeos.....	55
Tabela 12: Sequência de aminoácidos da LiTx1 e sequência ortólogas de <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i> com maior porcentagem de identidade.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCR	- <i>B Cell Receptor</i>
BSA	- <i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	- <i>DNA complementar</i>
CDR	- <i>Complementarity Determining Region</i>
CID	- <i>Collision Induced-Dissotiation</i>
CPPI	- <i>Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos</i>
DAB	- <i>3,3'-DiAminoBenzidine</i>
DEPC	- <i>DiEthylPyroCarbonate</i>
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	- <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
ECL	- <i>Enhanced ChemiLuminescence</i>
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fv	- <i>Fragment variable</i>
FR1	- <i>FRamework 1</i>
HÁ	- <i>Hyaluronic Acid</i>
HRP	- <i>Horseradish Peroxidase</i>
ICK	- <i>Inhibitor Cystine Knot</i>
Ig	- <i>Imunoglobulina</i>
IMAC	- <i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i>
IMGT	- <i>ImMunoGeneTics</i>
IPTG	- <i>IsoPropylThioGalactoside</i>
kDa	- <i>kilo Dalton</i>
L.	- <i>Loxosceles</i>
LB	- <i>Luria-Bertani</i>
mAb	- <i>Monoclonal Antibody</i>
MS	- <i>Mass Spectrometry</i>
OPD	- <i>Orto -PhenyleneDiamine</i>
PBS	- <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	- <i>PolyEthylene Glycol</i>
PLD	- <i>PhosphoLipase D</i>
ppm	- <i>parts per million</i>

PAGE	- <i>PolyAcrylamide Gel</i>
RNA	- <i>RiboNucleic Acid</i>
RNAse	- <i>Ribonuclease</i>
RT-PCR	- <i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i>
scFv	- <i>single chain Fragment variable</i>
SDS	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SINAN	- Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SPR	- <i>Surface Plasmon Resonance</i>
TBS	- <i>Tris-Buffered Saline</i>
TCTP	- <i>Translation Controlled Tumoral Protein</i>
TES	- Tris-EDTA-Sucrose
TFA	- TriFluorAcético
VH	- Cadeia variável pesada
VL	- Cadeia variável leve

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	13
1.1.1	Objetivo Geral.....	13
1.1.2	Objetivos Específicos	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	ARANHA MARROM	14
2.1.1	Características gerais	14
2.1.2	Composição do veneno	16
2.2	LOXOCELISMO.....	21
2.2.1	Diagnóstico.....	23
2.2.2	Tratamento	23
2.3	ENGENHARIA DE ANTICORPO RECOMBINANTE	25
2.4	JUSTIFICATIVA.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	FLUXOGRAMA.....	31
3.2	VENENOS	32
3.3	AMPLIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL	32
3.4	CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTICORPO MONOCLONAL	33
3.4.1	Imunoensaio Enzimático - <i>ELISA</i>	33
3.4.2	<i>Western blotting</i>	34
3.5	ENSAIO HEMOLÍTICO <i>IN VITRO</i>	34
3.6	ISOLAMENTO DO ANTÍGENO ALVO.....	35
3.6.1	Imunoprecipitação	35
3.6.2	Espectrometria de massa	36
3.7	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES VARIÁVEIS DO ANTICORPO	37
3.7.1	Extração de RNA e transcrição reversa.....	37
3.7.2	Amplificação das cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL).....	39
3.7.3	Sequenciamento genético	40
3.8	CONSTRUÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE SINTÉTICO	41
3.9	EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE	44
3.9.1	Transformação de bactérias <i>E. Coli</i>	44

3.9.2	Expressão e extração do fragmento de anticorpo recombinante.....	45
3.9.3	Purificação do fragmento de anticorpo recombinante.....	46
3.10	MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS.....	47
3.10.1	Síntese dos peptídeos em membrana de celulose.....	47
3.10.2	Teste de reatividade frente aos peptídeos ligados à membrana de celulose	49
4	RESULTADOS	49
4.1	CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTICORPO MONOCLONAL .	49
4.2	NEUTRALIZAÇÃO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE VENENO	
	<i>L. INTERMEDIA</i> PELO MAB12.....	52
4.3	ISOLAMENTO DO ANTÍGENO ALVO.....	53
4.4	SEQUÊNCIA DA CADEIA VARIÁVEL PESADA E LEVE.....	56
4.5	<i>DESIGN</i> DO GENE SINTÉTICO	57
4.6	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE	59
4.7	CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE	61
4.8	<i>ELISA</i> DE COMPETIÇÃO	65
4.9	MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS.....	66
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	70
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produção e caracterização do anticorpo monoclonal murino mAb12 e seus fragmentos recombinantes - scFv12P e diabody12P a fim de identificar seu possível papel no diagnóstico e tratamento do loxoscelismo.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil de interação dos anticorpos mAb12, scFv12P e diabody12P frente aos venenos de *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* através dos imunoenaios *ELISA* e *Western Blot*;
- Determinar o antígeno alvo do mAb12 pelas técnicas de imunoprecipitação e espectrometria de massa;
- Estabelecer o provável sitio de ligação do mAb12 as notinas e fosfolipases por meio do mapeamento de epítomos pela técnica de *Spot synthesis* e alinhamento das sequências primárias por instrumentos de análises *in silico*;
- Obter e caracterizar a sequência das regiões variáveis da cadeia pesada e da leve do mAb12 aplicando técnicas de extração e sequenciamento do material genético e a ferramenta IMGT;
- Construir o gene sintético e expressar o fragmento recombinante scFv12P e diabody12P empregando a tecnologia de engenharia de anticorpo.
- Avaliar potencial aplicação dos fragmentos recombinantes na detecção de componentes presentes no veneno de *Loxosceles*, empregando testes de *ELISA* de competição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARANHA MARROM

2.1.1 Características gerais

Loxosceles é o gênero de aranhas pertencentes à família *Sicariidae* da ordem *Araneae*, classe *Arachnida*, filo *Athropoda* e reino *Animalia*; descrito pela primeira vez em 1832 por Heineken e Lowe (Lucas, 2015; WSC, 2018). O nome *Loxosceles* significa “pernas inclinadas” e refere-se à maneira como a aranha posiciona suas pernas em relação ao resto do corpo (Tambourgi, et al., 2010). A morfologia característica dos aracnídeos consiste em corpo dividido em cefalotórax e abdômen revestido por um exoesqueleto articulado quitinoso, quatro pares de pernas ligados ao cefalotórax e fiandeiras no abdômen - utilizadas para a produção de seda -, um par de quelíceras e um par de palpos – apêndices articulados localizados perto da boca (Ruppert, et al., 2005).

A cor acastanha e a imagem semelhante a um violino no cefalotórax justificam os nomes populares aranha-marrom (Brasil) e aranha-violino (Portugal), comumente atribuídos aos membros do gênero *Loxosceles* (Gremski, et al., 2014). Essas aranhas variam de 1-5 cm de comprimento e apresentam dimorfismo sexual, cuja fêmeas possuem abdômen mais largo e injetam mais veneno. A disposição dos seis olhos em pares que não se tocam formam um U padrão que é utilizado como critério de reconhecimento do gênero *Loxosceles* (Figura 1) (Ruppert, et al., 2005). A aranha-marrom consegue viver meses sem alimento ou água e resistir à variação de temperatura de 8 a 43⁰C. Elas constroem teias irregulares que se assemelham a algodão e alimentam-se de baratas, grilos, dando preferência a presas mortas (Gremski, et al., 2014).

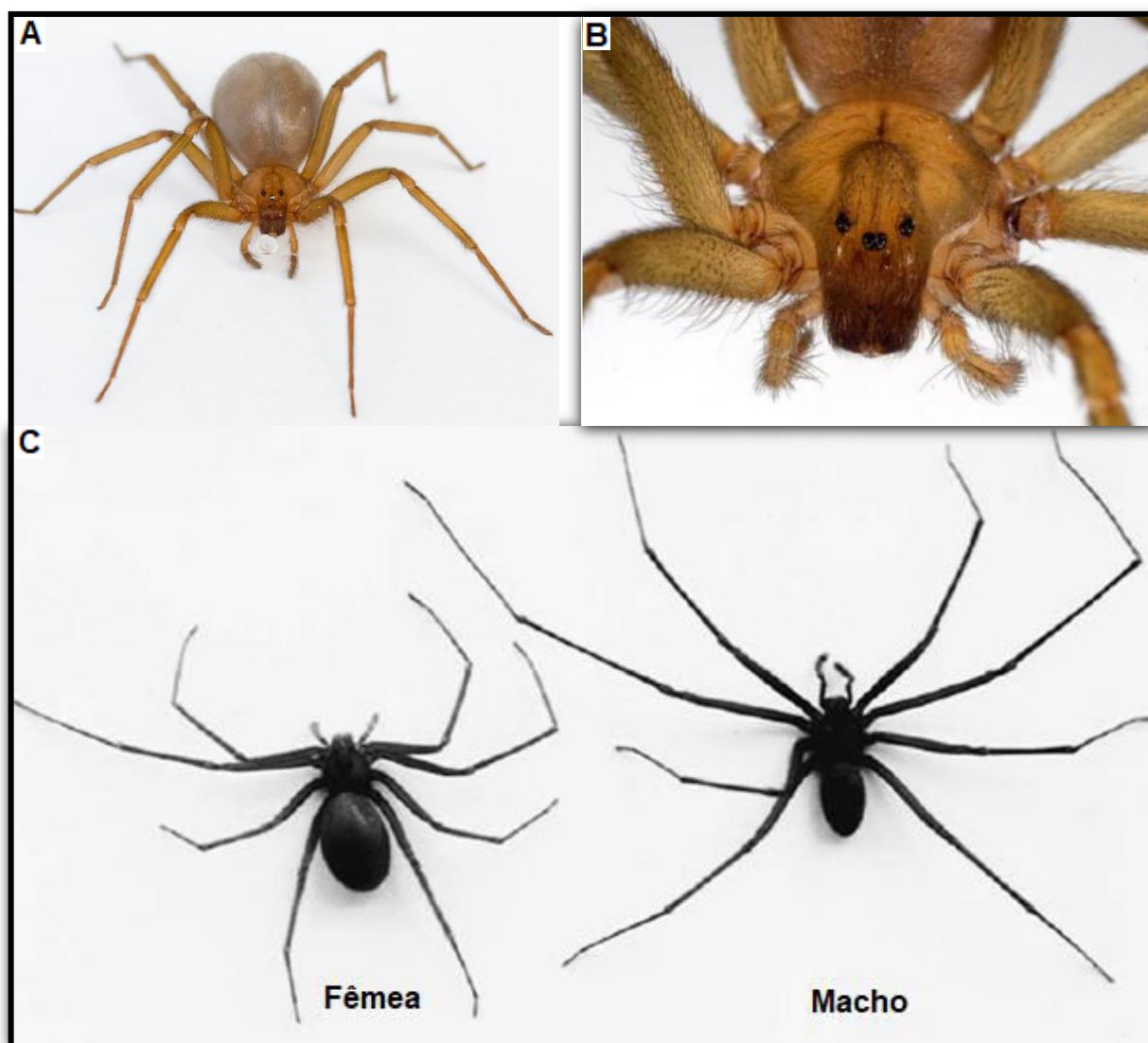


Figura 1: Morfologia da aranha do gênero *Loxosceles*.

Aspecto geral da aranha *Loxosceles* (A). Visão anterior de *Loxosceles* sp. observa-se a distribuição padrão dos seis olhos em pares em formato de U e pigmentação em forma de violino no cefalotórax (B). Dimorfismo sexual das aranhas (C).

Fonte: Adaptado de Herzig, *et al*, 2011; University of Arizona, 2013 e Silva, *et al*, 2004.

As aranhas-marrons estão presentes em todos os tipos de ambiente; têm hábitos noturnos e preferem habitar áreas escuras, secas, isoladas e protegidas; podendo ser encontradas em roupas escuras, atrás de móveis e em sótãos (Chaim, *et al.*, 2011). A distribuição de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* é mais centralizada no sul do Brasil, sendo as três espécies encontradas nos estados do Paraná e São Paulo (Figura 2).

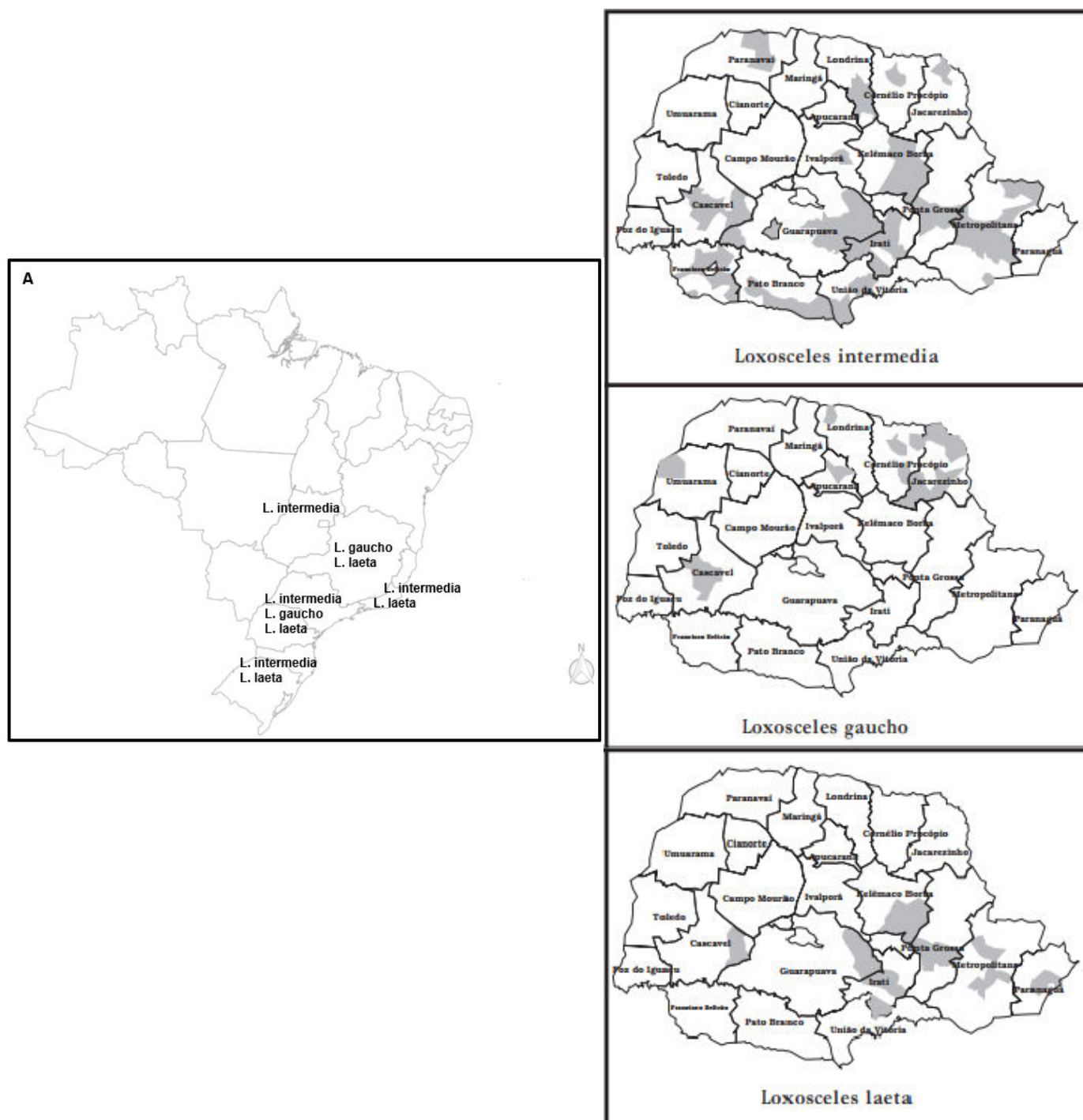


Figura 2: Distribuição geográfica das três espécies mais importantes do gênero *Loxosceles* no território brasileiro.

Distribuição de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* no Brasil (A) e distribuição *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* no estado do Paraná (B).

Fonte: Adaptado de Binford, *et al*, 2008 e Marques-da-Silva e Fischer, 2005.

2.1.2 Composição do veneno

O conhecimento do conteúdo completo do veneno das aranhas *Loxosceles* ainda está sob investigação. No entanto, sabe-se que sua composição bioquímica é uma mistura complexa de compostos biologicamente ativos, principalmente

proteínas e peptídeos com ação tóxica e/ou enzimática (Utkin, 2015). Análises comparativas das proteínas dos venenos brutos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* revelou uma grande similaridade entre os perfis eletroforéticos monodimensionais. Nos três venenos foram visualizadas duas regiões ricas em proteínas: 5 a 10 kDa e 30-35 kDa (Matsubara, et al., 2017). Este padrão também pode ser encontrado em estudos eletroforéticos bidimensionais (gel 2D), cuja maioria dos *spots* foram localizados entre o ponto isoelétrico (pI) 6 e 10 no veneno de *L. intermedia*, apresentando *spots* mais intensos no pI neutro (Gremski, et al., 2014). O perfil proteômico do mapa 2D é similar entre as diferentes espécies de *Loxosceles* como *L. adelaida*, *L. similis*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Machado, et al., 2005).

Em um estudo recente sobre o transcriptoma do veneno *L. intermedia* os componentes presentes foram divididos em moléculas altamente expressas: fosfolipases D (20,2% dos transcritos), astacinas (metaloproteínases - 22,8%) e notinas (53,5%); e com baixo nível de expressão (>5%): hialuronidase, serino protease, inibidores de serino protease, alérgenos e membros da família TCTP (Gremski, et al., 2010). No entanto, o padrão de expressão das toxinas varia entre espécies. Fernandes-Pedrosa, et al., (2008) descreveram a prevalência de transcrições codificando toxinas de fosfolipases-D na glândula de veneno de *L. laeta*. Posteriormente, Gremski, et al., (2010) postulou presença majoritária de transcrições codificando notinas na glândula de veneno de *L. intermedia*. Entretanto, na maioria das espécies prevaleceu as toxinas que diretamente desencadeiam os principais sinais e sintomas do envenenamento pelo gênero de *Loxosceles*. Além disso, constatou-se que os principais componentes envolvidos nos mecanismos de captura de presas para alimentação são as moléculas altamente expressas (Chaim, et al., 2011; Gremski, et al., 2014).

Características como qualidade, quantidade e composição do veneno são diretamente influenciadas pelo sexo, idade, espécie, estado nutricional e tamanho da aranha. O volume de veneno produzido é em torno de alguns microlitros, contendo aproximadamente 20 a 200µg de proteína total (da Silva, et al., 2004; Chaim, et al., 2011). Analisando o proteoma do veneno total de *L. intermedia* Trevisan-Silva, et al., (2017) identificaram sequências homólogas entre as proteínas nas diferentes espécies de *Loxosceles*; além de detectarem a prevalência majoritária das

fosfolipases-D, astacinas e notinas, corroborando com estudos do transcriptoma do veneno.

A molécula mais estudada do veneno de *Loxosceles* possui um papel importante no desenvolvimento dos principais sinais e sintomas do envenenamento. É comumente denominada como esfingomielinase-D a partir da primeira função bioquímica descrita a hidrólise da proteína esfingomielina (Chaim, et al., 2011). Entretanto, o termo fosfolipase-D (PLD) torna-se o mais adequado pois enfatiza o amplo conjunto de fosfolípidos hidrolisáveis, visto que estudos recentes relatam outros substratos - como glicerofosfolípidos e lisofosfolípidos - suscetíveis a atividade catalítica desta enzima (Figura 3) (Chaves-Moreira, et al., 2017; Gremski, et al., 2014).

A enzima PLD atua na degradação dos fosfolípidos das membranas celulares, desencadeando a perda de assimetria da membrana, exposição e reorganização da membrana. Mais especificamente, a degradação da esfingomielina modifica propriedades da membrana como fluidez e organização da camada lipídica (Mitsutake & Igarashi, 2007; Gomez-Cambronero, 2010; Chaim, et al., 2011). Presença de edema, eritema e necrose são indicativos de distúrbio na matriz extracelular e são comumente vistos nas picadas de aranha-marrom (Gremski, et al., 2014).

Por causarem dermonocrecrone as PLDs do gênero *Loxosceles* são também são conhecidas como toxinas dermonecróticas. Além disso, estas enzimas geram edema, hemólise, aumento da permeabilidade na parede dos vasos sanguíneos, resposta inflamatória maciça com infiltração de neutrófilos e ativação do complemento, agregação plaquetária, imunogenicidade, insuficiência renal, toxicidade celular e letalidade em animais (Tambourgi, et al., 2010). A massa molecular dessas enzimas variam de 30-35 kDa, caracterizando as bandas proteicas observada nesta faixa em um gel monodimensional (Matsubara, et al., 2017).

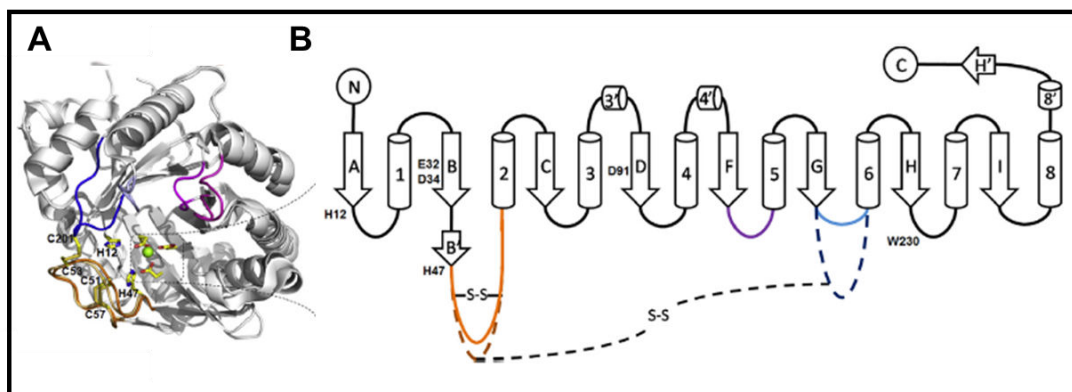


Figura 3: Fosfolipases-D (PLD).

Representação da estrutura da toxina de *L. laeta* (A), resíduos envolvidos na ligação metal-íon e catálise estão destacados. Topologia estrutural de fosfolipase-D (B), folhas- β (setas) e α -hélices (cilindros) formam a estrutura de barril da proteína. Loop catalítico indicado pela cor laranja em ambas figuras.

Fonte: Adaptado de Gremski, *et al.*, 2014.

Outra enzima presente no veneno é a hialuronidase, que possui massa molecular de aproximadamente 44kDa e está presente em todas espécies de *Loxosceles*. É considerada como um importante componente do veneno por aumentar a difusão de outras toxinas nos tecidos adjacentes à região de inoculação através da degradação de componentes da matriz extracelular. Dessa forma, contribui para a disseminação gravitacional característica da lesão dermonecrótica (da Silveira, *et al.*, 2007a; Chaim, *et al.*, 2011).

Astacinas são metaloproteases dependentes de zinco e dois tipos foram encontrados no veneno de *Loxosceles*: Loxolisina A de massa molecular de 20-28 kDa e com atividade fibronectinolítica e fibrinogenolítica; Loxolisina B de massa molecular de 32-35 kDa e com atividade gelatinolítica. O papel bioquímico e biológico dessas proteínas é pouco conhecido; estudos apontam que elas degradam algumas proteínas da matriz extracelular - fibronectina, fibrinogênio, gelatina e entactina -, entretanto sua função no efeito nocivo do veneno ainda não está totalmente elucidada (Chaim, *et al.*, 2011; da Silveira, *et al.*, 2007b).

O veneno de aranha-marrom evoluiu para possuir um arsenal de proteínas inseticidas com o intuito de paralisar e capturar suas presas, em especial insetos. Estas proteínas consistem em moléculas de cadeia única com baixa massa molecular (3-10kDa) e elevado número de cisteínas que formam pontes dissulfeto intramoleculares (Figura 4). Essas toxinas também são denominadas de notinas devido ao seu motivo estrutural caracterizado por um nó de cisteína inibitório

(*inhibitor cystine knot* – ICK) (Nicholson , 2006). A família de notinas atuam em canais iônicos, como sódio, cálcio, cloreto e potássio. Ao agirem em canais iônicos neuronais específicos de presas ou predadores causam paralisia flácida ou até mesmo morte (Chaim, et al., 2011; Matsubara, et al., 2017). Castro, *et al*, (2004) descreveram e caracterizaram três isoformas de proteínas inseticidas no veneno de *L. intermedia* – LiTx1, LiTx2 e LiTx3 – que possuem o motivo ICK e atuam em canais iônicos específicos. Quanto a especificidade do canal iônico, Castro, *et al*, (2004) postularam que a LiTx3 atua em canais para sódio. No entanto, o grupo não foi capaz de determinar se LiTx1 interage com canais para sódio ou cálcio e em quais canais iônicos LiTx2 atua. Em 2006, uma nova isoforma - LiTx4 – foi depositada no banco de dados de sequências genéticas (GenBank nº DQ388598.1).

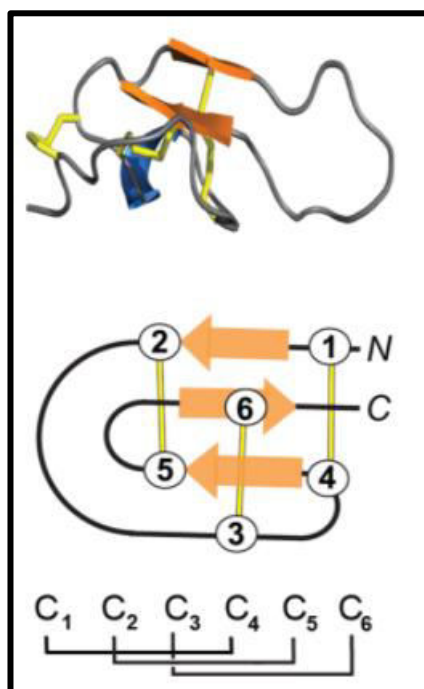


Figura 4: Motivo nó inibidor de cisteína (ICK).

Pontes dissulfeto são mostradas pelas linhas amarelas, a folha β pelas setas laranjas e a hélice α pela seta em azul. Estrutura 3D (parte superior). Representação esquemática do motivo ICK (parte inferior) As conexões de ligações dissulfeto para cada motivo são mostradas na parte inferior do painel, onde "C" significa cisteína e são rotulados de 1 a 6.

Fonte: Adaptado de Ojeda, *et al.*, 2018.

A proteína TCTP (do inglês *translation controlled tumoral protein*) possui esta denominação por ter sido identificada em um carcinoma mamário humano e por ser regulada a nível de tradução. No gênero *Loxosceles*, TCTP foi identificada no veneno de *L. Intermedia* e *L laeta*. Apesar de participar em vários processos biológicos, sua função não esta completamente elucidada. Um dos seus papéis é

desencadear a liberação de histamina em leucócitos (Chaim, et al., 2011; Sade, et al., 2012).

No veneno de *Loxosceles*, serino proteases foram descritas como zimogênios ativados pela tripsina. A tripsina, por sua vez, ativou duas moléculas de 85 e 95 kDa com ação gelatinolítica (Veiga, et al., 2000). Acredita-se que serino proteases estão envolvidas na digestão da presa e podem causar destruição tecidual, coagulação sanguínea e fribinólise. Os inibidores de serino protease agem na proteção da integridade de suas próprias toxinas, sendo os únicos capazes de inativar as serino proteases (Veiga, et al., 2000). Alérgenos também compõem o veneno de *Loxosceles*, mas pouco se sabe do seu papel nos acidentes com aranha-marrom (Gremski, et al., 2014).

2.2 LOXOCELISMO

A maior parte das espécies de aranhas são inofensivas aos humanos. De fato, 4 gêneros são considerados perigosos e de importância médica - *Latrodectus* (viúva-negra), *Loxosceles*, *Phoneutria* (armadeira), *Atrax* (aranha-teia-de-funil) (Appel, et al., 2005). Os três primeiros gêneros são encontrados no Brasil e o último é de origem australiana. Existem aproximadamente 130 espécies do gênero *Loxosceles*, são amplamente distribuídas por todos os continentes – exceto Antártica - e provavelmente todas possuem a capacidade de provocar sintomas clinicamente importantes. No entanto, as espécies responsáveis por causar acidentes em humanos no Brasil são *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Chaves-Moreira, et al., 2017). Os acidentes ocorrem predominantemente durante as épocas mais quentes do ano. No ano 2015 foram registrados 7.370 casos no Brasil (SINANa, 2016), cuja 3.834 das notificações pertencem ao Paraná (SINANb, 2016), tornando o envenenamento por aranhas-marrons um sério problema de saúde no país.

Loxoscelismo descreve a condição comumente manifestada após acidentes com aranhas-marrons. O quadro clínico depende de características tanto do indivíduo acometido como do veneno, dado que aranhas adultas injetam apenas alguns microlitros contendo em torno de 30 µg de proteína. Além disso, o local da picada, idade, estado de saúde e perfil biológico do paciente influenciam diretamente

no grau de envenenamento. A maioria das manifestações clínicas são benignas e restritas à região da picada, mas sintomas sistêmicos podem surgir e raramente levar ao óbito (da Silva, et al., 2004; Chaim, et al., 2011).

A picada por aranha-marrom é relativamente indolor e em muitos casos o paciente não percebe o ocorrido. Reações a picada tendem a ser locais, observa-se necroses cutâneas de coloração azul-violeta escura com propagação gravitacional que levam à formação de tecido cicatricial (Figura 5). Além disso, pode haver eritema e edema ao redor da lesão. Em cerca de metade dos casos, sintomas sistêmicos como febre, dor de cabeça, vômito e erupção aparecem em conjunto com as lesões cutâneas (Chaves-Moreira, et al., 2017). Depois de 2-8 horas pós picada dor leve a severa pode ocorrer, provavelmente devido a isquemia; além de eritema com prurido, inchaço e sensibilidade leve a severa.

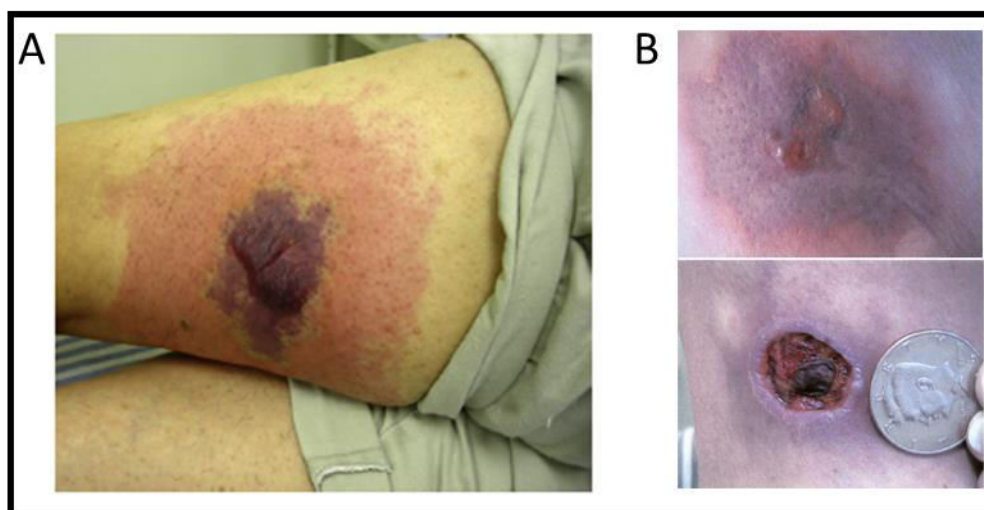


Figura 5: Reação local a picada de aranha-marrom.

A. Ferida de coloração azul-violeta com propagação gravitacional. Fonte: Adaptado de Tambourgi, et al., 2011.

B. Estágio inicial e tardio da picada por aranha-marrom. Fonte: Swanson, et al., 2006.

Além do loxoscelismo cutâneo (dermonecrótico) descrito acima, com menos frequência é observado manifestações mais sérias a nível sistêmico. O loxoscelismo sistêmico (cutâneo-visceral ou hemolítico) ocorre em aproximadamente 15% dos casos e afeta predominantemente crianças. Resulta em sintomas como febre, fraqueza, vômitos, hemólise intravascular - responsável pela anemia hemolítica, icterícia e hemoglobinúria -, coagulação intravascular disseminada - encontrado na

pele, pulmões, fígado e rim - e insuficiência renal aguda - principal causa da morte em loxoscelismo (Swanson & Vetter, 2006; Chaves-Moreira, et al., 2017).

2.2.1 Diagnóstico

Loxoscelismo é geralmente diagnosticado com base na evolução do quadro clínico do paciente e aspectos epidemiológicos. Fatores como local da picada, circunstância na qual a picada ocorreu, identificação do animal e região epidêmica ajudam a determinar o envenenamento pelo gênero *Loxosceles* (Malaque, et al., 2011; Gremski, et al., 2014). Entretanto, existem outras patologias que podem causar o desenvolvimento de lesão dermonecrotica. Dessa forma, a confirmação do diagnóstico pelo emprego de métodos mais concretos pode evitar a aplicação do tratamento incorreto.

Uma boa alternativa são os testes laboratoriais que podem ser desenvolvidos para detectar a presença de toxinas ou outros fatores determinantes do loxoscelismo. Ensaio de imunoabsorção enzimática são uma opção por serem testes rápidos, reprodutíveis, específicos e sensíveis. Atualmente não há nenhum ensaio laboratorial disponível comercialmente, porém alguns estudos desenvolveram ensaio imuno-absorvente no qual anticorpos policlonais foram usados para detectar o veneno em lesões ou soro do paciente (Gomez, et al., 2002; Stoecker, et al., 2006; Stoecker, et al., 2009).

2.2.2 Tratamento

Não há um tratamento sintomático padrão para loxoscelismo. Em diferentes partes do mundo são empregadas diferentes estratégias. Em alguns países o uso de anti-histamínicos, antibióticos, analgésicos e corticosteróides é frequente. Sendo uma medida para amenizar os sintomas, conter a lesão e prevenir infecções. Porém não há um consenso quanto à eficácia destes medicamentos. A severidade da picada pode ser estimada por meio de características clínicas e análise laboratorial tais como hemólise evidente e presença de creatina quinase no soro - indicador de rabdomiólise configurando existência de loxoscelismo sistêmico (Malaque, et al., 2011). Estabelecido o quadro de loxoscelismo sistêmico, medidas como hidratação

vigorosa e alcalinização da urina podem ser tomadas para evitar falência renal (Gremski, et al., 2014).

A soroterapia torna-se a única opção direcionada para tratar o envenenamento, pois possibilita a neutralização do veneno pelo emprego de anticorpos contra as toxinas venenosas. Os antivenenos produzidos no Brasil são de origem equina, consistindo em um conjunto de anticorpos heterólogos de afinidade e especificidade variada. A probabilidade de ocorrer reações de hipersensibilidade como reações alérgicas, choque anafilático e doença do soro é iminente. Um estudo constatou que um terço dos pacientes que receberam antiveneno desencadearam reações anafiláticas agudas (Malaque, et al., 2011; Chaves-Moreira, et al., 2017). Sendo assim, a soroterapia é feita com cautela sempre baseando-se no quadro clínico do paciente. Por isso, estudos que possam sugerir ou propor novas estratégias de inativação do veneno poderiam contribuir na resolução dos problemas atuais.

A neutralização de toxinas *in vivo* com anticorpos foi primeiro descrita em 1894 e é ainda a única escolha de tratamento para picada de aranha e picada de escorpião (Maynard & Georgiou, 2000). No Brasil, a produção de antivenenos data da década de 1960. Nos dias atuais, o Ministério da Saúde oferece dois antivenenos: soro antiloxoscélico - composto de anticorpos contra *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*, produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná - e soro antiaracnídeo – contra *Loxosceles gaucho*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis*, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo -. Além disso, o Peru produz antivenenos para *L. laeta* pelo Instituto Nacional de Saúde e o México produz contra *L. reclusa* no Instituto Bioclon (da Silva, et al., 2004; Gremski, et al., 2014).

No Brasil, o protocolo indicado é a administração intravenosa de antivenenos em casos de loxoscelismo com lesões cutâneas e cutâneos-hemolíticos. Sendo aconselhável mesmo 48 horas após o acidente se há a presença de hemólise. Ademais, o Ministério da Saúde brasileiro aconselha a administração de antivenenos e corticosteróides em casos de loxoscelismo classificados como moderado (lesão sugestiva ou característica, podendo ou não haver alterações sistêmicas) e grave

(lesão característica e alteração sistêmica), não sendo indicado para casos leves (lesão incompleta, sem alterações sistêmicas) (Ministério da Saúde, 2001). A gravidade da lesão cutânea determina a quantidade de antiveneno utilizada e quanto mais próximo ao momento do acidente é administrado maior será sua eficácia. O ideal é administrar de imediato ou até 12 horas após o envenenamento, sendo não recomendado após transcorrido 72 horas. Isto é corroborado no experimento de Pauli, *et al.*, (2009), cuja administração de antivenenos em coelhos após 6 e 48 horas da picada por aranha-marrom resultou em lesões necróticas 90% e 30% menores, respectivamente, ao comparar com o grupo controle (Pauli, *et al.*, 2009; Chaves-Moreira, *et al.*, 2017). Apesar do potencial de prevenção da lesão dermonecrotica ser gradativamente nulo ao passar do tempo pós picada, o antiveneno ainda pode ser eficiente para prevenir a extensão da lesão e limitar a ocorrência dos efeitos sistêmicos (da Silva, *et al.*, 2004; Pauli, *et al.*, 2006)

Em resumo, a eficácia do tratamento depende de uma série de fatores como: tempo decorrido entre o acidente e início do tratamento, gravidade do quadro, estado de saúde do paciente, volume e composição do veneno injetado, identificação da espécie do animal peçonhento e quantidade do medicamento administrado.

2.3 ENGENHARIA DE ANTICORPO RECOMBINANTE

A alta afinidade e especificidade ao ligante tornam o anticorpo ideal para diversas aplicações biomédicas e em indústrias alimentícias e agrícolas, podendo ser usado como instrumento terapêutico e reagente analítico. Dentre tantas potenciais finalidades, a neutralização de toxinas *in vivo*, agentes de terapia genética *in vivo*, radioimunodetectores em *imaging* e terapêuticos de câncer são os mais relevantes para o campo da engenharia de anticorpo (Maynard & Georgiou, 2000).

No organismo, o sistema imune é encarregado na proteção contra agentes infecciosos e tóxicos através de mecanismos que neutralizam e eliminam o invasor do corpo. As células B possuem o papel de reconhecer moléculas estranhas ao corpo através de receptores de superfície celular (B cell receptor -BCR), sendo ativadas e diferenciadas em células secretoras de BCR solúveis (também conhecidos como anticorpos). Uma única célula B produzirá um único anticorpo

especificamente contra um único epítopo. No entanto, antígenos distintos podem compartilhar um epítopo em comum, ou seja, uma mesma porção dos antígenos é reconhecida por um único anticorpo. Geralmente, o antígeno cujo anticorpo apresenta reação cruzada possui uma afinidade de ligação menor do que a interação com o antígeno que o anticorpo foi induzido contra (Sarantopoulos, 2014). A interação antígeno-anticorpo é um balanço de interações intermoleculares de atração e repulsão. É o resultado de ligações não-covalentes reversíveis como: pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre cadeias laterais (ligações lineares) e arranjos polipeptídicos (ligações conformacionais). A combinação de ligações fracas dos imunocomplexos é influenciada termodinamicamente, gerando uma interação suficientemente forte. Sendo que, modificações em resíduos de aminoácidos no sítio de ligação podem alterar a força de interação antígeno-anticorpo (Maynard & Georgiou, 2000; Laffly & Sodoyer, 2005; Dasch & Dash, 2014).

O anticorpo, denominado também como imunoglobulina (Ig), possui uma conformação característica em formato de “Y”. As imunoglobulinas estruturalmente arranjam-se em dobramentos de correntes beta antiparalelas que formam duas folhas beta. Essa folhas são conectadas por pontes de dissulfeto entre os resíduos de cisteínas (Figura 6A). A proteína IgG é formada por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, divididas em regiões variáveis (VH – cadeia variável pesada e VL – cadeia variável leve) e constantes (FIGURA 6B) conforme o grau de similaridade aminoacídica entre diferentes anticorpos (Maynard & Georgiou, 2000; Schroeder & Cavacini, 2010). A região variável possui esta denominação por ser o local de alta variabilidade na molécula, diferenciando um anticorpo do outro. A distribuição da variabilidade aminoacídica não é uniforme, há regiões de hipervariabilidade (HV) e regiões menos variáveis do arcabouço. A HV encontra-se nos *loops* entre as correntes beta, sendo também chamado de região determinante da complementaridade (complementarity determining region – CDR) por ser a qual liga-se à superfície do antígeno (Maynard & Georgiou, 2000; Dasch & Dash, 2014).

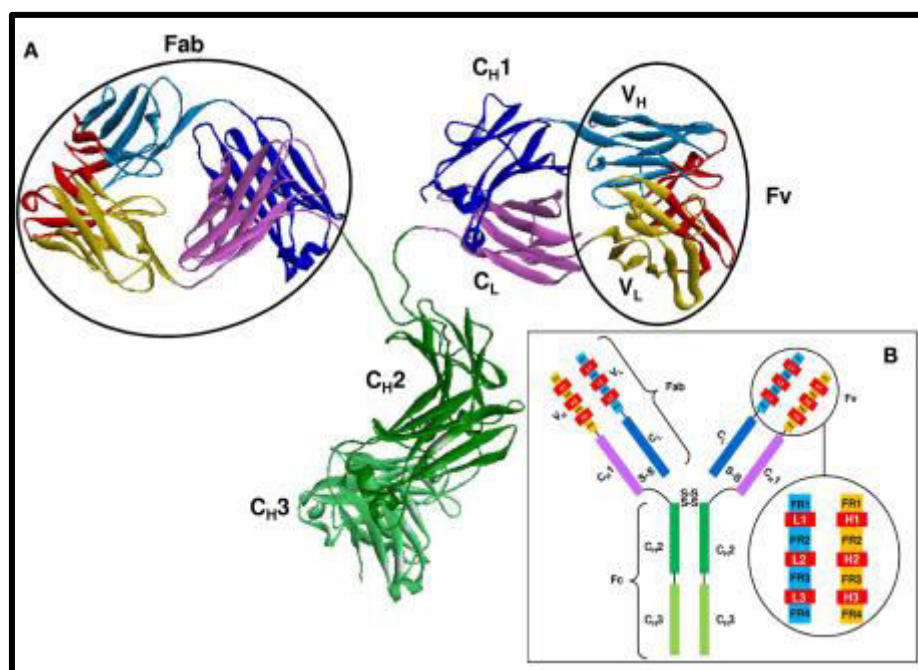


Figura 6: A estrutura de uma molécula de anticorpo.

Estrutura 3-D de uma molécula de anticorpo demonstrando arranjo das folhas betas (A). Representação esquemática da molécula de anticorpo (B). As ligações dissulfeto entre as cadeias pesadas e leves formam a estrutura “Y”, cada braço é conhecido como fragmento de ligação do antígeno (Fab) que é composto por dois domínios variáveis (V_H e V_L) e dois constantes (C_H1 e C_L). Os dois domínios variáveis leve e pesado dimerizam para formar o fragmento Fv (fração variável) que contém o sítio de ligação ao antígeno. Região hipervariável da cadeia leve (L1-L3) e pesada (H1-H3) é marcada pela cor vermelha. Dois domínios da cadeia pesada (C_H2 e C_H3) compõem a região Fc (fração cristalina) que é responsável pela formação da atividade biológica da molécula de anticorpo. Em ambas figuras o arcabouço da cadeia variável leve (V_L) está destacado pela cor amarela e da pesada (V_H) pela cor azul claro. As cadeias constantes pesadas são separadas pelas cores claro (C_H3), verde escuro (C_H2) e azul escuro (C_H1) e leves pela cor roxa (C_L).

Fonte: Adaptado de Sela-Culang, *et al.*, 2013.

A ideia de um agente presente no sangue capaz de defender o organismo contra invasores foi reportada por von Behring e Kitasato em 1890. Em seus experimentos eles demonstraram que animais expostos aos agentes causadores da difteria não desenvolviam a doença quando tratados com o soro de outros animais previamente infectados com esta bactéria atenuada (Winau & Winau, 2002; Schroeder & Cavacini, 2010). A soroterapia foi o primeiro método de imunização passiva para tratar doenças infecciosas. E com isso foi constatado e demonstrado a função neutralizante da molécula de anticorpo. Desde então, essa técnica usufrui dos mecanismos de defesa do sistema imune para tratar doenças infecciosas ou agentes tóxicos com anticorpos policlonais.

Em contraste com a soroterapia, a tecnologia de hibridoma é uma técnica mais refinada de produção de anticorpos por possibilitar a obtenção de anticorpos

monoclonais. Descrita em 1975 por Milstein e Köhler, essa técnica consiste na fusão de células da linhagem de mieloma com células B de animais imunizados, resultando em clones imortais provenientes de uma única célula B parental (Kohler & Milstein, 1975; Maynard & Georgiou, 2000; Filpula, 2007). A produção de anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody* – mAb) é uma das ferramentas centrais na biotecnologia, possuindo uma série de vantagens como: alta especificidade e afinidade; determinação do epítipo; ausência de anticorpos não específicos; maior facilidade de caracterização e reduzida variabilidade entre os lotes. Apesar do alto custo a técnica é muito explorada para geração de medicamentos principalmente na área de oncologia (Laffly & Sodoyer, 2005).

Graças ao desenvolvimento da tecnologia de hibridoma, a engenharia de anticorpos recombinantes tornou-se viável. Através do emprego da técnica de reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) e de sistemas procariotos de clonagem e expressão de genes são produzidos os fragmentos de anticorpo recombinante. A partir de mAb murinos são amplificadas as regiões VH e VL e com essas sequências genéticas inúmeros fragmentos de anticorpo recombinante podem ser construídos (FIGURA 7). O menor anticorpo recombinante disponível é o fragmento de cadeia única variável (*single-chain fragment variable* – scFv). Ele possui um conector polipeptídico de geralmente 15 aminoácidos (quatro glicinas mais uma serina, repetidos 3 vezes) que fornece flexibilidade suficiente para a cadeia VH e VL formarem uma conformação comparável com a do anticorpo parental (Maynard & Georgiou, 2000; Ahmad, et al., 2012). Quando o conector é reduzido para menos de 12 aminoácidos é favorecido a formação de dímeros - *diabody* – devido a interação da cadeia VL de uma molécula com a VH de outra. Uma vantagem é que o *diabody* possui maior afinidade funcional em comparação ao monômero scFv (Todorovska, et al., 2001). Além disso, o tamanho reduzido dessas moléculas – scFv ~27kDa e diabody ~50 kDa – permite a passagem em tecidos que a molécula inteira não consegue penetrar, rápida difusão e farmacocinética (Maynard & Georgiou, 2000; Filpula, 2007).

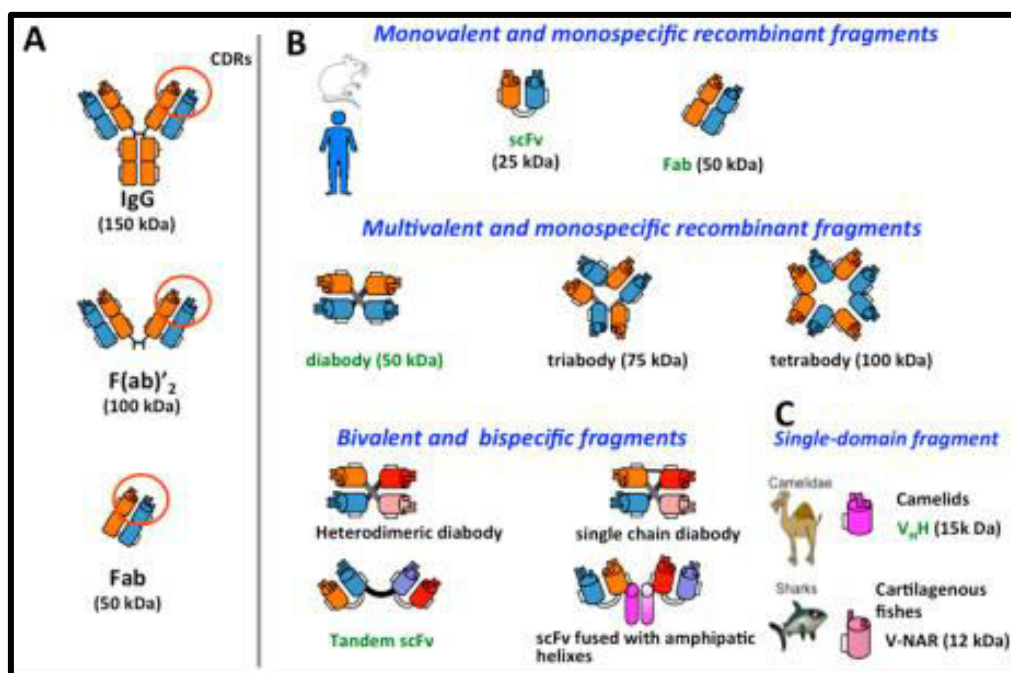


Figura 7: Modificações estruturais na molécula de anticorpo.

Fragmentos de anticorpos gerados por proteólise da molécula de anticorpo IgG inteira (A). Fragmentos de anticorpo recombinante construídos a partir de técnicas da engenharia molecular (B) e fragmentos de anticorpo recombinante alternativos aos anticorpos convencionais (C).

Fonte: Adaptado de Alvarenga, *et al.*, (2014).

O tamanho e a simplicidade da estrutura tornam a produção de fragmentos de anticorpo recombinante simples e barata. Além disso, eles possuem uma menor imunogenicidade em comparação com a molécula inteira de anticorpo (Nelson, 2010; Dasch & Dash, 2014). A purificação do fragmento recombinante é uma etapa crucial no processo de produção, sendo uma estratégia muito utilizada a inserção de uma cauda, geralmente de histidina (Young, *et al.*, 2017). No entanto, o uso de caudas pode ocasionar desvantagens como incorreto dobramento da estrutura, agregação ou perda de função da proteína, além de eventual imunogenicidade a cauda. Em contrapartida, o desenvolvimento fragmentos recombinantes livres de cauda como através do emprego da proteína L oferece uma opção para purificação e detecção destas moléculas (Muzard, *et al.*, 2009). A proteína L está presente na parede celular de 10% das cepas de *Peptostreptococcus magnus* e interage com resíduos da cadeia leve *kappa* na região FR1 (*framework 1*) sem interferir na interação antígeno-anticorpo da imunoglobulina (Rodrigo, *et al.*, 2015). Tal artifício já foi empregado com sucesso em outros modelos de fragmentos recombinantes (Lebozec, *et al.*, 2017). Neste projeto a purificação dos fragmentos recombinantes será através dessas duas estratégias: cauda de histidina e proteína L.

2.4 JUSTIFICATIVA

Desde a primeira produção dos antivenenos a estrutura do anticorpo neutralizante evoluiu muito. Atualmente, no Brasil, Argentina e México os anticorpos policlonais presentes no soro equino são submetidos a digestão enzimática com pepsina, que cliva a região de dobradiça da imunoglobulina especificamente a região carboxiterminal das pontes dissulfeto. O resultado são fragmentos funcionais $F(ab')_2$ que mantêm a propriedade de ligar-se ao antígeno (Morais, et al., 2014). Por não possuir a região efetora Fc , esses fragmentos possuem menor potencial imunogênico e de formação de agregados protéicos quando comparado a molécula de anticorpo inteira (da Silva, et al., 2004; Pauli, et al., 2009; Chaim, et al., 2011).

No entanto, a produção dos antivenenos possui uma série de pontos fracos. Tais desvantagens são a necessidade de coleta e extração de um grande número de veneno; o alto custo de manutenção dos cavalos imunizados, o uso de um grande número de coelhos para validação da capacidade de neutralização do soro, entre outros. Pensando nisso, grupos de pesquisa vêm buscando meios alternativos de produção de anticorpos contra o veneno de aranha-marrom.

Na literatura há descrito dois anticorpos monoclonais contra as esfingomielinases loxoscélicas: LimAb7 e LiD1mAb16. O LimAb7 é capaz de neutralizar a atividade hemolítica desta enzima no veneno de *L. intermedia* (Alvarenga, et al., 2003); e o LiD1mAb16 reconhece *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* mas não inibe 100% os efeitos dermonecróticos dos venenos (Dias-Lopez, et al., 2014). A partir do anticorpo monoclonal LimAb7, dois fragmentos recombinantes foram produzidos: $(scFv_{Li7})_2$ e $scFv-LimAb7/AP$. O *diabody* $(scFv_{Li7})_2$ manteve a capacidade de neutralização da atividade hemolítica e de esfingomielinase do veneno de *L. intermedia* (Karim-Silva, et al., 2016). A proteína bifuncional colorimétrica $scFv-LimAb7/AP$ possui limite de detecção de 39 ng/mL de *L. intermedia* circulante em soro humano (Jiacomini, et al., 2016). Além da busca de novas formas de detecção e neutralização do veneno, novos protocolos de imunização que não utilizem apenas o veneno total têm sido investigado. O uso de um peptídeo sintético imunogênico satisfatoriamente gerou anticorpos específicos contra o veneno de *L. intermedia* em camundongos e coelhos (Dias-Lopes, et al.,

2010). Já a proteína recombinante rLiD1 auxiliou na imunização de cavalos e posterior produção de anticorpos funcionais capazes de reconhecer diferentes espécies de *Loxosceles* (Duarte , et al., 2015).

Todos esses estudos exploram a principal proteína envolvida nos efeitos nocivos do veneno de *Loxosceles*. Entretanto, o conhecimento do papel de todos os componentes do veneno no contexto do loxoscelismo ainda é incompleto. Dessa forma, torna-se necessário a produção de insumos que possam ser empregados para a detecção, estudo e neutralização de tais toxinas. A produção de anticorpos monoclonais e fragmentos recombinantes específicos para os venenos loxoscélicos pode contribuir com melhorias no diagnóstico e tratamento do envenenamento por aranhas-marrons. Tais avanços na área de engenharia de anticorpo também auxiliam no posicionamento do Brasil em uma condição de maior independência tecnológica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA

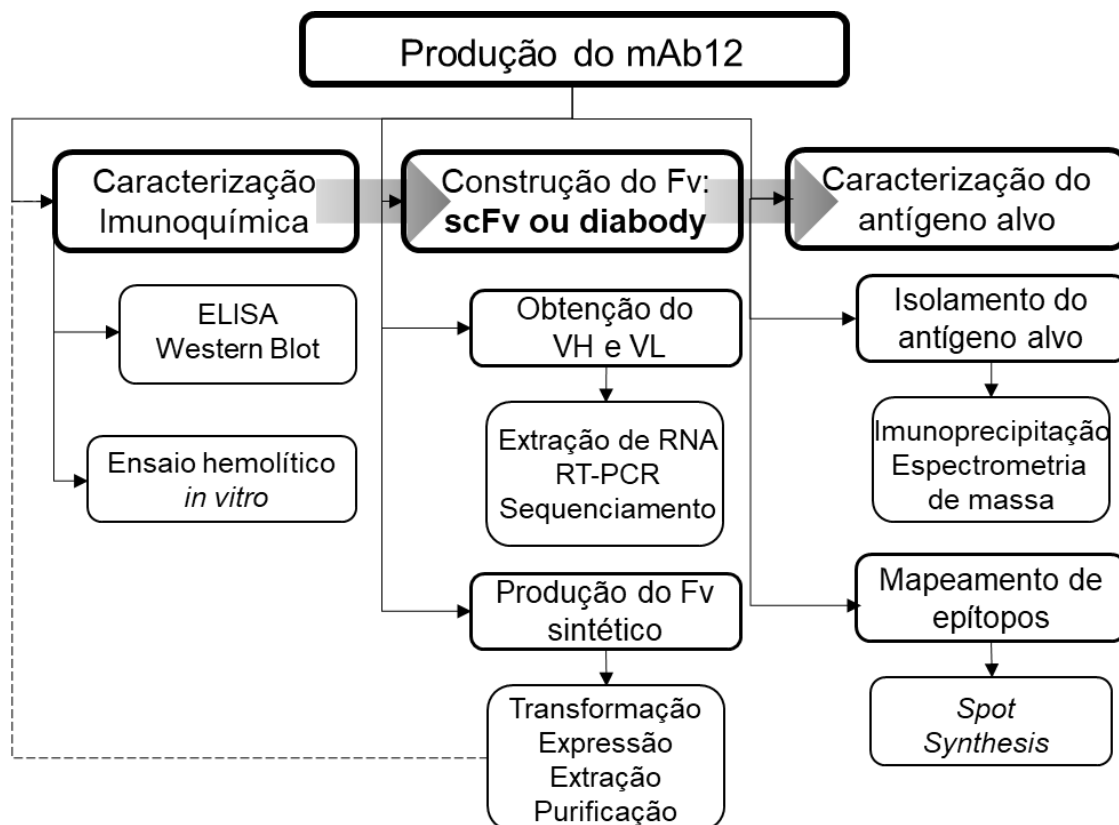


Figura 8: Principais etapas desenvolvidas no presente estudo.

Fonte: Acervo Pessoal.

3.2 VENENOS

Os venenos de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* foram gentilmente cedidos pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI – Piraquara, PR, Brasil). Todas as amostras foram dosadas pelo método de *Bradford* (Bradford, 1976), aliquotadas e armazenadas em -20°C .

3.3 AMPLIFICAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL

Em 2012 foram produzidos pelo grupo anticorpos monoclonais contra o veneno total de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* gerando assim o hibridoma mAb12.

As etapas para obtenção do anticorpo monoclonal (imunização, fusão, screening, clonagem, diluição limitante, etc.) foram realizadas anteriormente pelo grupo, empregando a mesma metodologia descrita por Becker *et al.* (2013).

Alíquotas do hibridoma armazenadas a -80°C foram descongeladas e cultivadas em meio de cultivo celular suplementado (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* DMEM – Sigma -, 10% soro fetal bovino – Gibco - e 1% de penicilina-estreptomicina – ThermoFisher Scientific) mantidas em estufa incubadora com atmosfera de CO₂ (5%) incubadas a 37°C (Greenfield, 2014).

O anticorpo monoclonal murino foi purificado a partir do sobrenadante do hibridoma secretor mAb12 por cromatografia de afinidade usando proteína A imobilizada em Sepharose CNBr- (Sigma) nas condições descritas pelo fabricante. A eluição ocorreu com glicina (0,1M pH2,8) em frações de 0,5 mL. Amostras foram dialisadas contra tampão fosfato-salino pH 7,4 (do inglês *phosphate buffered saline* – PBS) (Fishman & Berg, 2014).

Todas as amostras foram dosadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976), aliqüotadas e armazenadas em -20°C.

3.4 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTICORPO MONOCLONAL

Para a caracterização imunoquímica tanto do anticorpo monoclonal quanto dos fragmentos recombinantes da fração variável (Fv) - scFv e diabody - foram empregadas técnicas de imunodeteção do antígeno.

Para detecção do mAb12, scFv12P ou diabody12P utilizaram-se reagentes marcados com peroxidase: anti-mouse (Sigma) e proteína-L (ThermoFisher Scientific) foram usados na diluição 1:4000. O anticorpo anti-histidina (ThermoFisher Scientific) foi diluído 1:1000 e marcado pelo anti-mouse 1:4000, por ser produzido em camundongo.

3.4.1 Imunoensaio Enzimático - ELISA

Concentrações de 2,5 ou 5µg/mL de veneno de *L. gaucho*, *L. intermedia* ou *L. laeta* em 0,02M de tampão de bicarbonato de sódio (pH 9,6) foram adsorvidos em

placas de poliestileno *NUNC (ThermoFisher Scientific)* durante 16 horas a 4°C em seguida realizou-se a saturação com caseína 2% durante uma hora a 37°C, para evitar ligações inespecíficas.

Concentrações dos anticorpos primários (mAb12, scFv12P ou diabody12P) variaram conforme o formato de *ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)* utilizado, porém sempre preparados para volume final de 100 µL/poço e incubados por uma hora a 37°C. Anticorpos secundários (anti-mouse, proteína L ou anti-histidina) e terciários (anti-mouse) foram utilizados no mesmo volume final e incubados nas mesmas condições que o anticorpo primário, variando apenas nas diluições usadas.

No *ELISA* indireto, concentrações decrescentes do anticorpo primário, com fator de diluição 2, foram testadas frente ao antígeno. No *ELISA* de competição, concentrações fixas do anticorpo primário principal foram estabelecidas com base na absorbância entre 0,600-0,800 apresentada no *ELISA* indireto, enquanto o competidor variou em concentrações decrescentes com fator de diluição 2.

Após a incubação do anticorpo conjugado com peroxidase, a solução de substrato (orto-fenilenodiamina – OPD, *Sigma*) foi adicionada (100 µL/poço) e deixada agir durante 20 minutos na ausência de luz. A reação foi parada com H₂SO₄ 1:20 (20 µL/poço) e mensurou-se a absorbância em um leitor de placas de *ELISA (microplate reader 550, BIORAD)* no comprimento de onda de 490 nm. Entre cada etapa, os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem (0,15M NaCl, 0,05% Tween 20). Todos os ensaios foram realizados em duplicata (Becker-Finco, et al., 2013; Kohl, 2014).

3.4.2 Western blotting

Proteínas do veneno de *L. gaucho*, *L. Intermedia* e *L. intermedia* (5 µg), previamente desnaturadas por calor (5 minutos a 100°C), foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5% - m/v) contendo detergente dodecilsulfato de sódio que promove a desnaturação das proteínas (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis - SDS-PAGE*) e transferidas para membrana de nitocelulose 0,45 µm. Após o bloqueio com tampão *PBS*

contendo 5% (m/v) de leite seco sem gordura e 0,3% (v/v) de detergente Tween 20; incubou-se com anticorpo primário (mAb12, scFv12P ou diabody12P) e em seguida anticorpo secundário (anti-mouse, proteína L ou anti-histidina) e terciários (anti-mouse), diluído em PBS e 0,05% (v/v) de Tween 20 quando necessário. Todas as incubações ocorreram por 1 hora a 37°C e entre cada etapa a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS e 0,05% (v/v) de Tween 20.

A reatividade dos imunocomplexos formados foi detectada pela oxidação do substrato (diaminobenzidina e 4-cloronaftol – dab-cloronaftol ou luminol, *Sigma*) em presença de peroxidase do reagente marcado e peróxido de hidrogênio. Os reagentes cromogênicos dab-cloronaftol foram incubados com a membrana por no máximo 15 minutos para a visualização de bandas coradas. A reação por quimioluminescência (do inglês *enhanced chemiluminescence - ECL*) utilizou o filme *Amersham Hyperfilm (GE Healthcare)* e tempo de exposição variou conforme incidência luminosa detectada. Todos experimentos possuíam os controles positivo e/ou negativo apropriados (Alvarenga, et al., 2003; Litovchick, 2014)

3.5 ENSAIO HEMOLÍTICO *IN VITRO*

A hemólise é um dos efeitos nocivos ocasionados pelo envenenamento com o veneno de *Loxosceles*. Antivenenos são administrados afim de neutralizar esta atividade hemolítica assim como outras complicações. Dessa forma, a obtenção de um anticorpo monoclonal capaz de inibir a hemólise é essencialmente importante. Afim de averiguar o potencial de neutralização da atividade hemolítica pelo mAb12 realizou-se ensaio hemolítico *in vitro*. Sangue humano foi coletado em tubos contendo tampão citrato de sódio (*BD Plastipak, Franklin Lakes*), centrifugado a 200g por 15 minutos para retirada do soro. As hemácias foram lavadas 3 vezes com tampão *Ringer* com lactato (6 mg/mL de cloreto de sódio; 0,3 mg/mL de cloreto de potássio; 0,2 mg/mL de cloreto de cálcio di-hidratado; 3,1 mg/mL de lactato de sódio e água para injetáveis q.s.p. 100mL). Em um primeiro momento, veneno *L. intermedia* (2,5 µg/mL) e diferentes concentrações molares de mAb12 (320 e 160 pmol/mL) foram incubados por 1 hora e meio a 37°C, além de um ponto somente com veneno foi feito como controle de hemólise. Em seguida, adicionaram-se 10⁸ eritrócitos humanos aos tubos, que foram incubados por 24 horas a 37°C sob suave

agitação. As amostras foram centrifugadas a 200g por 5 minutos e mensurada a absorbância do sobrenadante recuperado no espectrofotômetro a 570nm, mesmas condições foram empregadas por Chaves-Moreira, *et al.*, (2009). Realizou-se ensaio em duplicata com controle negativo (solução *Ringer*) e positivo (eritrócitos em água destilada e 0,1% (v/v) de Triton X-100). Como controle do potencial de neutralização dos anticorpos, 320 pmol de anticorpo anti-loxoscélico (*horse anti-Li*) foram incubados com 2,5 µg/mL de veneno. Porcentagem de hemólise foi calculada sendo os valores do controle positivo considerados 100% de lise.

3.6 ISOLAMENTO DO ANTÍGENO ALVO

3.6.1 Imunoprecipitação

Com o intuito de isolar o antígeno alvo da mistura complexa do veneno total de *L. gaucho* uma coluna de afinidade foi confeccionada com mAb12 acoplado à agarose (*Sepharose 4B Cyanogen Bromide-Activated, Sigma*). Para tal fim, pesou-se 1 grama de agarose que foi lavado com HCl (1mM, por cinco vezes), sendo centrifugado entre as lavagens a 4.000g por 5 minutos. Após duas lavagens com tampão de ligação (NaHCO₃, 0,1M) adicionou-se mAb12 (1 grama) a coluna e incubou-se a composição por 16 horas a 4°C, sob agitação suave. Em seguida, a agarose foi sedimentada por centrifugação, descartado o sobrenadante e adicionado glicina (20 mL, 0,2M pH 8,0 - por 16 horas a 4°C, sob agitação suave) para desfazer ligações fracas e inespecíficas. Por último, foi centrifugada a amostra para retirar a glicina e adicionadas soluções de alto (tampão de carbonato de sódio 0,1M pH 8,3 com 0,5M de NaCl) e baixo pH (tampão de acetato de sódio 0,1M pH 4,0 com 0,5M NaCl), alternando 5 vezes de cada, afim desativar grupos de éster de cianeto reativos (Kavran & Leahy, 2015). O pH da coluna foi neutralizado com duas lavagens de PBS (pH 7,4) e adicionado 1 grama de veneno *L. gaucho* que foi incubado por 16 horas a 4°C, sob agitação suave, para purificar o antígeno alvo. A eluição foi feita com glicina (0,1M pH 2,8) e os purificados foram analisados em gel *SDS-PAGE* (15% de gel de acrilamida, m/v), sendo corados por prata.

3.6.2 Espectrometria de massa

A proteína purificada foi determinada de acordo com a massa molecular por eletroforese em *SDS-PAGE* (15% de gel de acrilamida, m/v), bandas identificadas por coloração de nitrato de prata foram encaminhadas para Plataforma Proteômica, subunidade de Espectrometria de Massa – PR, Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, para em sequência realizar as etapas de processamento e análise da amostra.

Em um primeiro momento foi feito o corte e descoloração do gel, para em sequência realizar as etapas de redução, alquilação e digestão enzimática (tripsina, *Sigma*) das proteínas em gel, seguido da extração dos peptídeos do gel. Metade da massa dos peptídeos eluídos do gel *SDS-PAGE* foi injetado no cromatógrafo *Easy-nLC 1000* (*ThermoFisher Scientific*); a separação dos peptídeos ocorreu com gradiente linear de 60 minutos de 5-40% de acetonitrilo, 5% de DMSO, 0,1% ácido fórmico em uma coluna analítica de 15 centímetros, com diâmetro interno de 75 µm e partículas de C18 de 3 µm, aquecida a 60°C. Logo após os peptídeos foram ionizados por *nano eletrospray* (voltagem de 2,7 kV) e injetados no espectrômetro de massas *LTQ Orbitrap XL ETD* (*ThermoFisher Scientific*), onde os íons gerados foram analisados fragmentados (detecção *MS/MS*, do inglês *Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) ou mantidos intactos (detecção *MS*).

O método de análise *MS/MS* consistiu em uma varredura inicial no *Orbitrap* em uma resolução de 15.000, seguido da seleção dos 10 íons mais intensos, os quais foram submetidos a fragmentação do tipo *CID* (do inglês *Collision Induced-Dissotiation*) e analisados no *Orbitrap Mass Analyzer*. Paralelamente, no método *MS* foi realizada uma varredura completa dos íons no *Orbitrap* com uma resolução de 60.000. Na seleção dos íons foi usada uma lista de exclusão de 90 segundos. Também se usou a opção *lock mass* para obter uma maior precisão – erro abaixo de 0,5 p.p.m. - da massa dos peptídeos tripticos (gerados pela digestão triptica) detectados pelo *MS*. Parâmetros definidos da máquina podem ser observados na tabela 1.

Os dados obtidos foram processados no software *PEAKS*, o qual baseou-se no banco de dados *Araneomorphae* contendo as sequências proteicas de

Loxosceles e também identificou os espectros sem o uso do banco específico (*de novo sequencing*). Demais parâmetros de pesquisa estão definidos na tabela 2.

Fonte de Íon	Método de fragmentação	Método de varredura MS	Método de varredura MS/MS
ESI (<i>nano-spray</i>)	<i>CID, CAD</i> (ions y e b)	<i>FT-ICR/Orbitrap</i>	<i>Linear Ion Trap</i>

Tabela 1: Parâmetros do instrumento LTQ Orbitrap XL ETD.

Fonte: Acervo Pessoal.

Tolerância de erro de massa principal	20.0 ppm
Tolerância de erro de massa de fragmento	0.5 Da
Tipo de pesquisa de massa precursora	Monoisotópico
Modificações fixas	Carbamidometilação: 57.02
Modificações variáveis	Oxidação (M): 15.99 Acetilinação (terminal N): 42.01
Máximo de modificações pós-traducionais por peptídeo	5
Banco de dados	Araneomorphae
Taxonomia	Todos

Tabela 2: Parâmetros de pesquisa do software PEAKS.

Fonte: Acervo Pessoal.

3.7 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES VARIÁVEIS DO ANTICORPO

3.7.1 Extração de RNA e transcrição reversa

A partir dos hibridomas murinos de mAb12, aproximadamente 5×10^5 células.mL⁻¹, foi realizada a extração de RNA total (RNA_t) utilizando reagente Trizol (*Ambion Life Technologies*). Para isso, duas garrafas (24 cm³) de cultivo celular contendo o mAb12 foram lavadas com PBS (1X) após a retirada do meio de cultivo e adicionou-se Trizol na proporção 1 mL para cada 10 cm³ de volume da garrafa. Decorrido 5 minutos de incubação a temperatura ambiente (25°C) sob suave agitação, cada mL do lisado foi distribuído em tubos de microcentrifuga (*Eppendorf* 1,5 mL fundo cônico) com clorofórmio na proporção 1:1, afim de purificar o material genético. Para formação de emulsão os tubos foram cuidadosamente invertidos, em seguida, centrifugados a 15.000g por 20 minutos a 4°C. Recuperou-se a fase aquosa em tubos contendo isopropanol (proporção 1:1), incubando por 16 horas a -20°C. Após centrifugação (mesmas condições) o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 75% (diluído em água ultra-pura, tratada com dietil

pirocarbonato - DEPC). Tubos foram novamente centrifugados (13.000g por 10 minutos a 4°C) e sobrenadante descartado. A cada tubo, adicionaram-se 30 µL de água DEPC para ressuspender o *pellet*. O RNA total foi dosado no espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop 2000*) (Fields, et al., 2013) e armazenado a -20°C até as próximas etapas e -80°C por tempo indefinido.

Com o RNA extraído foi realizada uma reação de transcrição reversa por RT-PCR (do inglês *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) para obtenção do DNA complementar (DNAc). A reação foi preparada para um volume final de 20 µL, sendo dividida em duas partes conforme ilustrado na tabela abaixo, seguindo indicações do fabricante (*Invitrogen/ThermoFisher Scientific*). A amostra foi armazenada a -20°C para posteriores aplicações e a -80°C indefinitivamente (Fields,

REAÇÃO - parte 1		REAÇÃO – parte 2	
Amostra de RNA	~ 5 µg	Tampão <i>First-strand</i>	1x
<i>Oligo(dT)</i>	2,5 µM	<i>DTT</i>	5 mM
<i>dNTP mix</i>	50 µM	Inibidor de <i>RNase</i>	40 U
Água DEPC	q.s.p. 13 µL	<u><i>SuperScript™ III Reverse Transcriptase</i></u>	200 U
VOLUME FINAL DA REAÇÃO		20 µL	
→ Incubar por 5 minutos a 65°C e 2 minutos a 4°C		→ Incubar por 60 minutos a 50°C → Inativação 70°C por 15 minutos	

et al., 2013).

Tabela 3: Reação de transcrição reversa.

Descrição dos reagentes e respectivas concentrações.

Fonte: Acervo Pessoal.

3.7.2 Amplificação das cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL)

Amplificação do cDNA afim de obter as cadeias variáveis pesada (VH) e leve (VL) de acordo com protocolo de Fields *et al*, 2013, demonstrado na tabela abaixo. Os seguintes pares de *primers* foram utilizados:

- Para VH

IGH-Forward: GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG

IGH-Reverse: GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG

- Para VL

Vkappa-Forward: GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC

Vkappa-Reverse: GAT ATT GTT CTC ACC CAG TCT

A-		Reação	Controle Negativo (µL)
Água DEPC		50 µL q.s.p.	50 µL q.s.p.
Tampão <i>Rxn</i> (10x)		1x	1x
MgCl ₂		0,75 mM	0,75 mM
dNTP		0,2 mM	0,2 mM
cDNA		2µL	-
Primer forward		20 nM	20 nM
Primer reverse		20 nM	20nM
Platinum Taq®		1,25 U	1,25 U

B- Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	95°C por 5 minutos	-	-
2-31	95°C por 1 minuto	55°C por 2 minutos	72°C por 3 minutos
32	-	-	72°C por 7 minutos

Tabela 4: Reação de PCR para amplificação da região hipervariável de cadeia pesada e leve.
 Descrição dos reagentes e respectivas concentrações (A) e parâmetros dos ciclos termais (B).
 Fonte: Adaptado de Fields *et al*, 2013.

O produto de amplificação da cadeia VL foi submetida a digestão enzimática com *Bci*VI afim de detectar presença de cadeia leve *kappa* aberrante, cuja transcrição resulta em uma imunoglobulina afuncional (Juste, et al., 2006). O produto de PCR foi verificado em gel de agarose 2% e; após purificação pela coluna *Invitex*® (*Invisorb Spin DNA Extraction Kit*, conforme especificações do fabricante); a sequência de cada cadeia foi inserida ao vetor plasmídeo *PGEM T-easy* (*Promega*) e células competentes *Escherichia coli* (*E. coli*) TG1 foram transformados com este vetor para amplificação das sequências de interesse.

A seleção de colônias positivas foi feita por α -complementação com IPTG/X-gal (*Sigma/ThermoFisher Scientific*) e a reação de PCR de colônia confirmou a presença do inserto. O DNA plasmidial das colônias positivas foi extraído pela técnica de *Miniprep* (Fields, et al., 2013).

3.7.3 Sequenciamento genético

Após crescimento bacteriano da colônia positiva em meio *Luria-Bertani* (LB; 10 gramas de peptona; 5 gramas de extrato de levedura e 10 gramas de cloreto de sódio em q.s.p. 1000 mL de água destilada, pH 7,4) por 16 horas a 37°C sob agitação de 250 rpm, o meio de cultura (a cada 1,5 mL em tubo de microcentrífuga ausente de material genético) foi centrifugado a 4.000g por 2 minutos a temperatura ambiente até perfazer 6 mL; descartado o sobrenadante, acrescentaram-se 200 µL de solução 1 (50 mM de glicose, 25 mM de tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 8,0) e após homogeneização amostra foi mantida a 4°C por 2 minutos. Em seguida, adicionaram-se 400 µL de solução 2 (0,2 M de NaOH e 1% de SDS) incubado em condições iguais a anterior; acrescentaram-se 300 µL de solução 3 (7,5 M de acetato de amônia) ao tubo e, após homogeneização e incubação de 5 minutos a 4°C, foi centrifugado a 15.000g por 10 minutos a 4°C. Recuperado o sobrenadante em novo tubo, adicionou-se clorofórmio na proporção de 1:1, invertendo-se até completa emulsão e foi centrifugado a 15.000g durante 5 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e repetiu-se etapa com clorofórmio. Com a última fase aquosa recuperada em novo tubo foi acrescentado isopropanol na proporção 1:1, homogeneizado, mantido a -20°C por 15 minutos e centrifugado a 15.000g durante 15 minutos a 4°C. Descartado o sobrenadante por inversão do tubo, adicionou-se 1 mL de etanol 70% a 4°C (preparado na hora com água DEPC) e amostra foi centrifugado a 13.000g durante 2 minutos a 4°C. Desprezado o etanol, novamente a amostra foi centrifugada (condições iguais a anterior) e deixada em estufa a 37°C. Após completa evaporação do etanol o *pellet* foi ressuspendido em 20 µL de água DEPC (Fields, et al., 2013).

Com o material purificado e dosado no espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop 2000*) foi realizada reação de sequenciamento e purificação da amostra para análise em sequenciador 3500XL, *Applied Biosystems, Genetic Analyzer*, seguindo o modelo de sequenciamento de DNA por *SANGER*. A reação de sequenciamento (tabela 5) utilizou 250 ng de DNA plasmidial, *primers Big Dye terminator* (1 µL, *ThermoFisher Scientific*) e *primer T₇* universal (0,5 µL, *ThermoFisher Scientific*) juntamente com tampão *Save Money* (3 µL) e água DEPC (q.s.p. 10 µL). A purificação foi feita em tubo livre de material genético e protegido da

luz com 10 µL de água DEPC, 2 µL de acetato de amônia (7,5M) e 66 µL do produto de sequenciamento; incubado a 20°C por 16 horas; centrifugado a 15.000g durante 30 minutos a 4°C; descartado sobrenadante e adicionado 100 µL etanol 70 % a 4°C (preparado na hora com água DEPC), centrifugado novamente e deixada em estufa a 37°C para evaporação do etanol (Fields, et al., 2013).

A- REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO (µL)			
Tampão Save Money			3
Big Dye terminator			1
Primer específico			0,5
Água DEPC			10 q.s.p.

B- Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	95°C por 1 minuto	-	-
2-36	95°C por 15 segundos	55°C por 15 segundos	72°C por 4 minutos
37	-	-	72°C por 7 minutos

Tabela 5: Reação de sequenciamento.

Descrição dos reagentes e respectivas concentrações (A) e parâmetros dos ciclos termais (B).

Fonte: Acervo Pessoal.

3.8 CONSTRUÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE SINTÉTICO

Single-chain variable fragment

Uma vez obtida a sequência do *VH* e *VL*, o gene foi sintetizado (*Genscript*, Piscataway, NJ, USA) desenhado para conter a sequência de *VH* e *VL* fusionadas por um *linker* peptídico (*Gly₄Ser*)₃; sítios de restrição *Pst*I e *Xho*I antes e após *VH*-*VL*; sítio de restrição *Bam*H I entre *linker* e *VL*, e a sequência líder *Pe*I B (para expressão periplasmática do fragmento recombinante em procariotas) (Fields, et al., 2013; Jiacomini, et al., 2016). Além da inserção da sequência para uma cauda de histidina foi realizadas modificações na sequência N-terminal da região *FR1* da cadeia leve afim de incluir resíduos de aminoácidos interagem com a proteína L (Muzard, et al., 2009). A expressão desta sequência, inserida no vetor psW1, origina uma estrutura monomérica da fração variável do anticorpo mAb12, sendo designado scFv12P por conter o domínio da cadeia variável pesada conectado por um ligante flexível ao domínio da cadeia variável leve.

Diabody

Para expressão do diabody sintetizou-se o *primer Li12DiaForInt* que insere um sítio de restrição *BamH1* no meio do *linker*, reduzindo-o para 5 aminoácidos (*Gly₄Ser*), quando submetido o gene sintético a uma reação de PCR convencional (tabela 6) com os *primers Li12DiaForInt* e *pswH1Rev*. Em seguida, digeriu-se o produto de *PCR* com as enzimas de restrição *Pst1* (*ThermoFisher Scientific*) e *BamH1* (*Biolabs*), conforme parâmetros da tabela 7, produzindo a sequência *VH-linker (Gly₄Ser)* com extremidades coesivas. O mesmo par de endonucleases foi aplicado na digestão do *psW1+scFv12P* resultando na sequência do vetor *psW1* com apenas o *VL* (Figura 9). Tanto o produto de *PCR* quanto as digestões foram verificadas em gel de agarose, sendo observado no gel do produto da digestão duas bandas de tamanhos distintos e a banda de interesse foi determinada pelo padrão de pares de bases (Fields, et al., 2013).

A-		Reação	
Água DEPC		50 µL q.s.p.	
Tampão (10x)		1x	
MgCl ₂		1,5 mM	
dNTP		0,4 mM	
cDNA		2µL	
Primer forward		500 nM	
Primer reverse		500 nM	
Taq		1,25 U	

B- Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
1	95°C por 5 minutos	-	-
2-36	95°C por 30 segundos	55°C por 30 segundos	72°C por 90 segundos
37	-	-	72°C por 7 minutos

Tabela 6: Reação de PCR convencional.

Descrição dos reagentes e respectivas concentrações (A) e parâmetros dos ciclos termais (B).

Fonte: Acervo Pessoal.

Digestão	
DNA	2 µg produto de PCR/ 10 µg plasmídeo
Tampão (10x)	1x
<i>BamH1</i>	5U/10U
<i>PsT1</i>	10U/20U
Água DEPC	50µL q.s.p.
→ Incubação 60 minutos a 37°C	

Tabela 7: Reação de Digestão.

Descrição dos reagentes e respectivas concentrações.

Fonte: Acervo Pessoal.

As bandas cortadas dos géis de agarose foram purificadas conforme especificações do kit de purificação *PCR, DNA and gel band purification* (GE Healthcare Illustra GFX). As extremidades coesivas obtidas nas duas digestões foram conectadas em uma reação de ligação nucleotídica com a enzima T4 ligase (Promega), de acordo com parâmetros demonstrados na tabela 8. Devido ao tamanho reduzido do *linker* o fragmento recombinante diabody12P forma uma estrutura dimérica, ou seja, dois scFv entrelaçados; ato necessário para que ocorra o dobramento conformacional da molécula VH-VL.

	Reação	Controle negativo
Tampão T₄	1x	1x
T₄ ligase	1,5 U	1,5 U
Vetor	~ 50 ng; razão 4:1 (inserto/vetor)	
Inserto	~ 200 ng	-
Água DEPC	20 µL q.s.p.	20 µL q.s.p.
→ Incubação a 16°C durante 16 horas		
→ Inativação a 70°C durante 5 minutos		

Tabela 8: Reação de Ligação.

Descrição dos reagentes e respectivas concentrações.

Fonte: Acervo Pessoal.

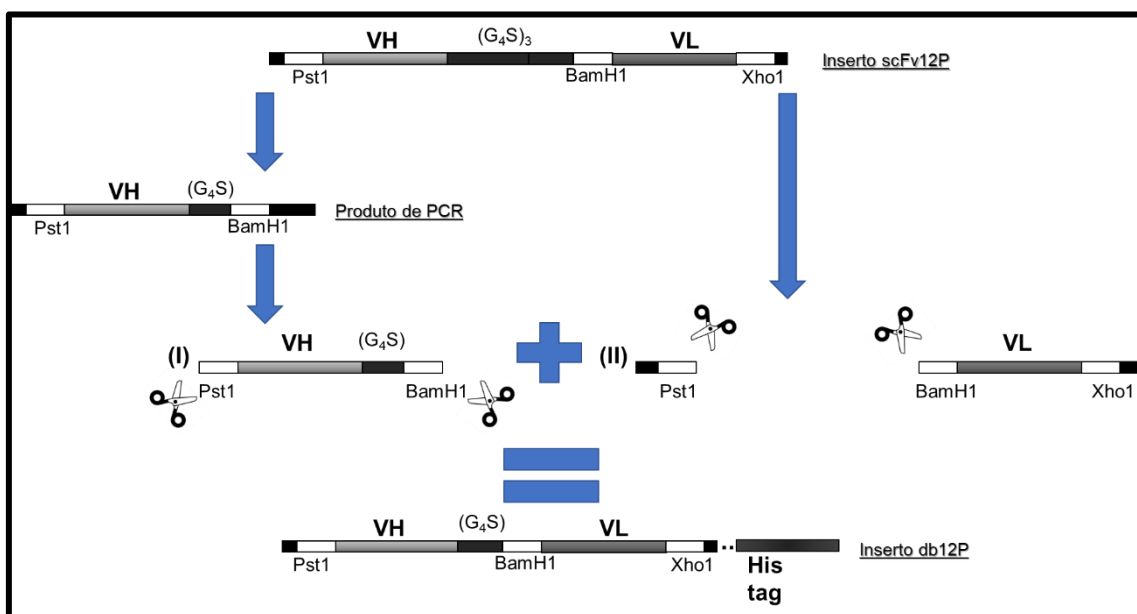


Figura 9: Ilustração esquemática da construção do diabody12P.

O inserto scFv12P presente no plasmídeo psW1 foi amplificado com *primers* específicos afim de inserir um sítio de restrição *BamH1* no meio do *linker* (G₄S)₃ reduzindo-o para 5 aminoácidos (G₄S) após digestão do produto de PCR pelas enzimas de restrição *Pst1* e *BamH1* (I). Em contrapartida, sequência genética completa do plasmídeo psW1 com inserto scFv12P foi digerida pelo mesmo par de endonucleases afim de retirar sequência genética referente ao VH-*linker* (G₄S)₃ (II). O produto das duas digestões foi submetido a reação de ligação pela enzima de ligação nucleotídica T₄ ligase resultando na sequência genética para expressão proteica do diabody12P.

Fonte: Acervo Pessoal.

O produto da ligação, psW1+diabody12P, foi transformado em *E. coli* (TG1) afim de amplificar o material genético. As colônias positivas foram selecionadas com ampicilina (100 µg/mL, Vetnil), pois o plasmídeo psW1 confere a bactéria resistência a este antibiótico e confirmadas por reação de *PCR* de colônia com os *primers* *Li12DiaForInt* e *pswH1Rev* do plasmídeo psW1. O plasmídeo foi extraído das colônias positivas e sequenciado afim de confirmar a sequência nucleotídica e inseri-lo em sistema bacteriano de expressão proteica.

3.9 EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE

3.9.1 Transformação de bactérias *E. Coli*

Utilizaram-se bactérias *E. coli* da cepa HB2151 para a produção do fragmento recombinante - scFv12P ou diabody12P. As bactérias HB2151 tornaram-se quimiocompetentes na presença cloreto de cálcio (CaCl_2) para receber o material genético (vetor+inserto) por choque térmico. Para isso, pré-inóculo (10 mL de meio *Luria-Bertani* (LB) e 100 µg/mL de ampicilina/selecionador) de HB2151 cresceu por 16 horas a 37°C e sob agitação de 200rpm; 1% do pré-inóculo foi utilizado em um inóculo em meio LB (100 mL) que foi mantido sob agitação (250 rpm a 37°C) até fase exponencial de crescimento $A_{600\text{nm}}$ atingisse 0,400-0,700; inóculo foi centrifugado (5000g por 10 minutos a 4°C) e sobrenadante descartado; células sedimentadas foram ressuspensas com CaCl_2 (0,1M – 20% do volume de meio LB centrifugado) e mantidas a 4°C por 30 minutos; transcorrido o tempo, fez-se nova centrifugação e células foram ressuspensas com CaCl_2 (10% do volume centrifugado). Na transformação genética, adicionou-se o plasmídeo de interesse (~150 ng/µL) em 1 mL de células quimiocompetentes; após período de homogeneização (30 minutos a 4°C), realizou-se processo de choque térmico (90 segundos a 42°C e 120 segundos a 4°C), período de reconstituição da membrana celular (45 minutos a 37°C, sob agitação 150 rpm) e plaqueamento em superfície da amostra (20 mL de meio LB ágar - 1,5% m/v - e 100 µg/mL de ampicilina por placa de Petri; amostra fracionada em 50, 200 e 750 µL). Verificou-se o crescimento de colônias bacterianas após incubação em estufa (16 horas a 37°C).

3.9.2 Expressão e extração do fragmento de anticorpo recombinante

Após conferida a presença do plasmídeo por *PCR* de colônia em colônia positivas, seguiu-se para a expressão do fragmento recombinante em meio de cultivo celular 2XTY (16 gramas de peptona; 10 gramas de extrato de levedura e 5 gramas de cloreto de sódio em q.s.p. 1000 mL de água destilada, pH 7,4). Dessa forma, foi realizado pré-inóculo das colônias positivas de HB215151 (16 horas a 37°C, sob agitação de 250rpm); com 1% do pré-inóculo, inóculo em meio 2XTY (100 mL) foi mantido sob agitação (250 rpm a 37°C) até fase exponencial de crescimento alcançasse A_{600nm} entre 0,650 – 0,800. Procedeu-se à indução da expressão proteica por meio da adição de 0.8 mM tiogalactosídeo isopropílico (do inglês *isopropylthiogalactoside* - *IPTG*) ao cultivo bacteriano e incubação por 16 horas a 16°C, sob agitação de 150 rpm (Muzard, et al., 2009; Zahid, et al., 2011).

Para a extração periplasmática, as células coletadas após centrifugação (5000g, 20 min, 4°C) foram submetidas a um choque osmótico pela adição de tampão TES (0,2M tris-HCl, pH 8.0; 0,5mM EDTA; 0,5M sucralose) em dois momentos: ressuspendidas as células com tampão TES (2% do volume de cultura original) e mantidas por 15 minutos a 4°C, e adicionado tampão TES diluído 1:4 com água destilada (3% do volume de cultura original) e mantidas por 30 minutos a 4°C. Passado o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada (20.000g, 4°C, 30min), recuperado o sobrenadante e o extrato periplasmático foi extensivamente dialisado (16 hora a 4°C) contra solução salina tamponada com fosfato (*PBS*) a pH 7,4 (Muzard, et al., 2009; Zahid, et al., 2011).

3.9.3 Purificação do fragmento de anticorpo recombinante

Os fragmentos recombinantes scFv21P e diabody12P foram purificados por cromatografia de afinidade com 1,5 mL de proteína L agarose (*Pierce™ Protein L agarose, ThermoFisher Scientific*) e/ou de níquel agarose (*Ni Sepharose 6 Fast Flow - GE Healthcare*). Após centrifugação a 20.000g por 10 minutos a 4°C, o extrato periplasmático (40 mL) foi adicionado a coluna de purificação, previamente preparada (agarose lavada com água *miliQ* e *PBS*), e incubado sob suave agitação por 16 horas à 4°C. A coluna passou por lavagem com 20 mL de tampão apropriado - *PBS* (pH 7,4) quando proteína L agarose e tampão fosfato (300 mM de NaCl, 50 mM de

Na_2HPO_4 e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 7,4) quando níquel agarose. Em seguida, as proteínas recombinantes foram eluídas em frações de 0,2 ml com o eluente específico: glicina (0,1 M, pH 2,2) para proteína L agarose e imidazol (150mM) para níquel agarose (Muzard, et al., 2009; Zahid, et al., 2011).

Afim de aumentar o rendimento proteico do fragmento recombinante diabody12P, amostras de extrato periplasmáticos foram submetidas a purificação em sistema de cromatografia (*ÄKTA chromatography*, *GE Healthcare*) realizados na Plataforma de Purificação de Expressão de Proteínas-PR, Instituto Carlos Chagas - Fio Cruz. No cromatógrafo inseriu-se a coluna de afinidade de purificação de proteínas marcadas com histidina (*HisTrap™ HP*, 1 mL, *GE Healthcare*) e programa de eluição foi definido da seguinte forma: por 20 volumes de coluna (CV) 0-4% de solução B (500mM de imidazol em tampão fosfato), 4-10% por 10 CV e 10-100% por 5 CV.

As frações que continham as proteínas recombinantes foram seleccionadas com reagente *Bradford* e dialisadas contra PBS (pH 7,4) (Muzard, et al., 2009; Zahid, et al., 2011). Amostras dialisadas foram analisadas por eletroforese em gel *SDS-PAGE* (15% de acrilamida, m/v) e evidenciadas com coloração *Coomassie* (*ThermoFisher Scientific*); e testadas por *Western blotting* aplicando-se 30µL da preparação (3:4 de amostra e 1:4 de tampão de amostra 4X concentrado) em gel de *SDS-PAGE* (15% de acrilamida, m/v); transferrindo para membrana de nitrocelulose; adicionando marcador de cauda de histidina (1:1.000) ou proteína L (1:4.000) e corando os imunocomplexos com o substrato dab-cloronaftol.

3.10 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS

3.10.1 Síntese dos peptídeos em membrana de celulose

A técnica de síntese múltipla de peptídeos paralelos sobre membrana de celulose (Frank, 2002) – *Spot synthesis* – foi empregada para análise do sítio de interação antígeno-anticorpo e assim estabelecer seus epítomos lineares. Com base na sequência da proteína identificada – LiTx1 (Tabela 9) –, peptídeos de 15 aminoácidos sobrepostos de três em três foram sintetizados pelo Dr. Ricardo Andrez na Universidade Federal do Paraná – Brasil. Nosso grupo já possuía uma membrana

de celulose contendo peptídeos que cobrem sequências de aminoácidos de fosfolipases do veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* (Tabela 9), que foi previamente sintetizada através da mesma técnica.

As membranas de celulose contendo os peptídeos foram preparadas de acordo Laune, *et.al.*, 2002. Essa técnica permite a síntese rápida e eficiente de um grande número de peptídeos, em delimitações pontuais por volume de deposição de cada resíduo. Os aminoácidos protegidos por um grupamento FMOC foram depositados em um volume de aproximadamente 0,6 µL no sintetizador automático (*ResPep/Multipep Automatic synthesizer – Intavis*), permitindo obter aproximadamente 40 nanomoles de peptídeo por ponto na membrana.

A síntese dos peptídeos iniciou-se sempre pelo aminoácido C-terminal das sequências estabelecidas para cada ponto. Para isso, é retirado o grupo FMOC acoplado à função amina do aminoácido pela adição de uma solução de 4-metil-piperidina 25% em dimetilformamida (DMF). Feito isso, o aminoácido torna-se disponível para reação com o próximo aminoácido a ser acoplado.

Os aminoácidos a serem acoplados foram ativados por uma mistura 1:1 de DIPC (diisopropilcarbodiimida) e Oxima Pura e depositados sobre a membrana. Para cada aminoácido foram realizados dois ciclos de acoplamento. As funções amina que permaneceram livres após o acoplamento foram acetiladas com anidrido acético 10% em DMF, a fim de se evitar reações colaterais com os aminoácidos posteriormente adicionados.

A membrana foi lavada com etanol e DMF durante cada etapa de acoplamento e desproteção. O grupo protetor FMOC do aminoácido recém-acoplado foi novamente eliminado em meio básico pela solução de 4 metil-piperidina a 25%. Os ciclos se sucederam desta forma até completar a sequência do peptídeo desejado.

Ao final da síntese, os grupos laterais protetores dos aminoácidos foram retirados pelo tratamento da membrana com uma solução contendo 92,5 % de ácido trifluoracético (TFA) associado a 2,5% de 1,2-etanoditiol, 2,5 % de trietilsilano e 2,5 % de água mili-Q.

Espécie/ Proteína/ Referência/ Nº. Localizador	Sequência primária
<i>L. intermedia</i> LiTx1/ MATSUBARA et al., 2017/ Nº. Q6B4T3.1	KCHGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAW SSTSECRCAMDCSRRCK
<i>L. intermedia</i> LiD1/ KALAPOTHAKIS et al., 2002/ Nº. 33348850	AGNRRPIWIMGHMVNAIGQIDEFVNLGANSI ETDVSFDDNANPEYTYHGIPSDSGRNSKKY ENFNDFLKGLRSATTPGNSKYQEKLVLVVF LKTGSLYDNQANDAGKKLAKNLLQHYWNN NNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFKDQLTKD GHPELMDKVGHD FSGNDDIGDVGKAYKKAG ITGHIWQSDGITNSLPRGLSRVNAAVANRDS ANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIM TNYPDVITDVLNEAAYKKKFRVATYDDNPWV TFKK
<i>L. laeta</i> SMase I - código PDB:1xx1/ FERNANDES-PEDROSA et al., 2002/ Nº. 60594087	ADNRRPIWNLAHMVNAVAQIPDFLDLGANAL EADVTFKGSVPTYTYHGTPSDFGRDSIRWE YFNVFLKTLREYTTTPGNAKYRDGFILFVLDL KTGSLSDNQVRPAGENVAKELLQNYWNNGN NNGRAYVVLSPDIGHYEFVRGFKEVLKKEG HEDLLEKVG YDFSGPYLPSLPTLDATHEAYK KAGVDGHIWLS DGLTNFSPLGDMARLKEAIK SRDSANGFINKIYYWSVDKVSTTKAALDVG VGIMTNPVNLIGVLKESGYNDKYRLATYDD NPWETFKN
<i>L. gauchol</i> A1H – LoxGal/ SILVESTRE et al., 2005 / Nº. 74954961	AGNRRPIWIMGHMVNAIGQIDEFVNLGANSI ETDVSFDDNANPEYTYHGIPSDSGRNSKKY ENFNDFLKGLRSATTPGNSKYQEKLVLVVF LKTGSLYDNQANDAGKKWAKNLLQHYWNN NNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFKDQLTKD GHPELMDKVGHD FSGNDDISDVGKAYKKAG ITGHIWQSDGITNSLPRGLSRVNAAVANRDS ANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIM TNYPDVITDVLNEAAYKKKFRVATYDDNPWV TFKK

Tabela 9: Sequência de aminoácidos das proteínas sintetizadas em membrana de celulose.

3.10.2 Teste de reatividade frente aos peptídeos ligados à membrana de celulose

A reatividade do mAb12 frente aos peptídeos sintéticos lineares foi testada por imunoenensaio. Após bloqueio da membrana com 3 % de albumina (do inglês *bovine serum albumin* – BSA) e 0,1% de Tween contido em tampão TBS (KCl 0,002 M, Tris 0,05 M em salina, pH 7.4) durante 16 horas a 4°C, a membrana foi incubada com mAb12 (1; 5; 10 e 100 µg/mL) em TBS contendo 1% de BSA e 0,01% de Tween por 90 minutos a 37°C. Em seguida, incubou-se com anticorpo anti mouse

conjugado a peroxidase (1:8.000) durante 60 minutos a 37°C. Controle positivo foi realizado com soro de cavalo anti-loxoscélico 1:3.000 e marcado com anti-horse conjugado a peroxidase 1:30.000, ambos incubados durante 60 minutos a 37°C. Controles negativos foram feitos incubando apenas anticorpo conjugado (60 minutos a 37°C). A formação de imunocomplexos foi detectada por quimioluminescência, utilizando o filme *Amersham Hyperfilm* (GE Healthcare). Entre cada etapa a membrana foi lavada três vezes com TBS. Na regeneração a membrana é lavada três vezes, durante 10 minutos, com uma solução A (uréia 8 M, SDS 1%, m/v) e b-mercaptoetanol 0,1% ,v/v) seguido da lavagem com solução B (etanol/água/ácido acético 5:4:1) pelo mesmo tempo e repetições, finalizando com lavagem em metanol.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTICORPO MONOCLONAL

O anticorpo monoclonal, previamente produzido pelo nosso grupo, reconhece os venenos das três espécies mais frequentes em acidentes Loxoscélicos no Brasil: *Loxoceles gaucho*, *Loxoceles intermedia* e *Loxoceles laeta*.

A caracterização imunoquímica do anticorpo monoclonal – mAb12 – foi feita através das técnicas de imunodeteção *ELISA* indireto e *Western blotting*. Em um primeiro momento foi testado a reatividade do sobrenadante celular recuperado do cultivo celular do hibridoma de mAb12 (Figura 10A), confirmando a reatividade alta frente aos venenos. Observou-se que o mAb12 reconhece os três venenos de maneira dose dependente apresentando maior reatividade para o veneno de *L. gaucho*, seguida por *L. intermedia* e por último para *L. laeta*. (Figura 10B).

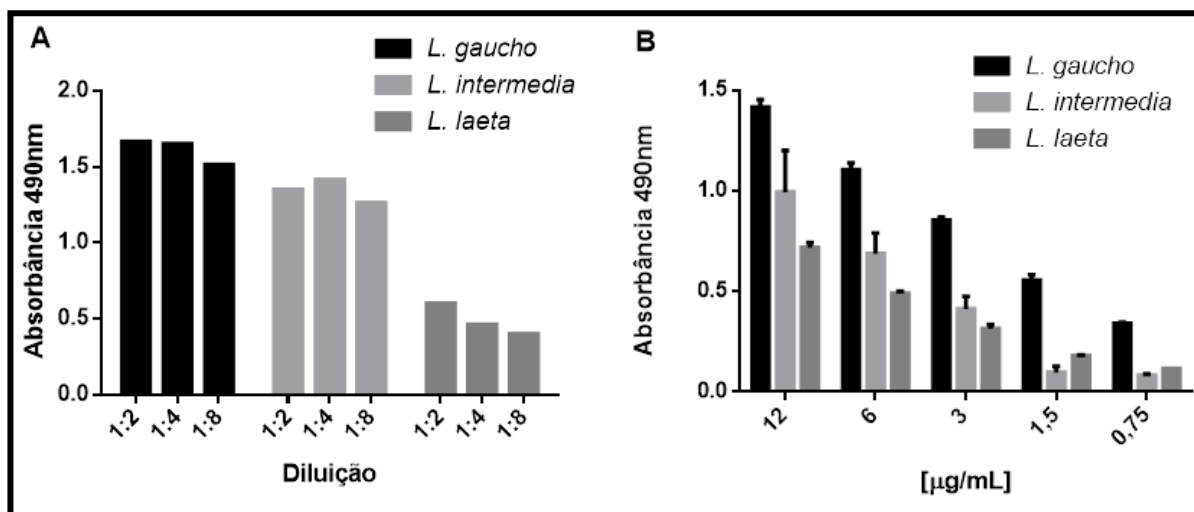


Figura 10: Reatividade do mAb12 frente aos venenos loxoscélicos.

Placas de *ELISA* foram adsorvidas com 5 e 2,5µg/mL (figura A e B respectivamente) de veneno *L. gaucho*, *L. intermedia* ou *L. laeta*. Reatividade do mAb12 foi avaliada com diferentes concentrações do anticorpo pré (A) e pós (B) purificação do sobrenadante celular. Formação de imunocomplexo foi detectada pela adição de peroxidase conjugada ao anti-mouse e substrato OPD. Valores observados são a média das duplicatas após descontado o controle negativo (veneno e anti-mouse-HRP).

Fonte: Acervo Pessoal.

A fim de verificar qual fração de proteínas do veneno total de *Loxocles sp.* é o alvo antigênico do mAb12, utilizou-se a técnica de *Western blotting*, no qual as proteínas dos venenos de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* foram separadas por eletroforese, transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com mAb12 (FIGURA 11). O anticorpo monoclonal reconhece proteínas de baixa massa, na faixa de 5-10 kDa, podendo se tratar das notinas, inibidoras de nó de cisteína (ICK) ou inseticidas (de Castro, et al., 2004; Matsubara, et al., 2017).

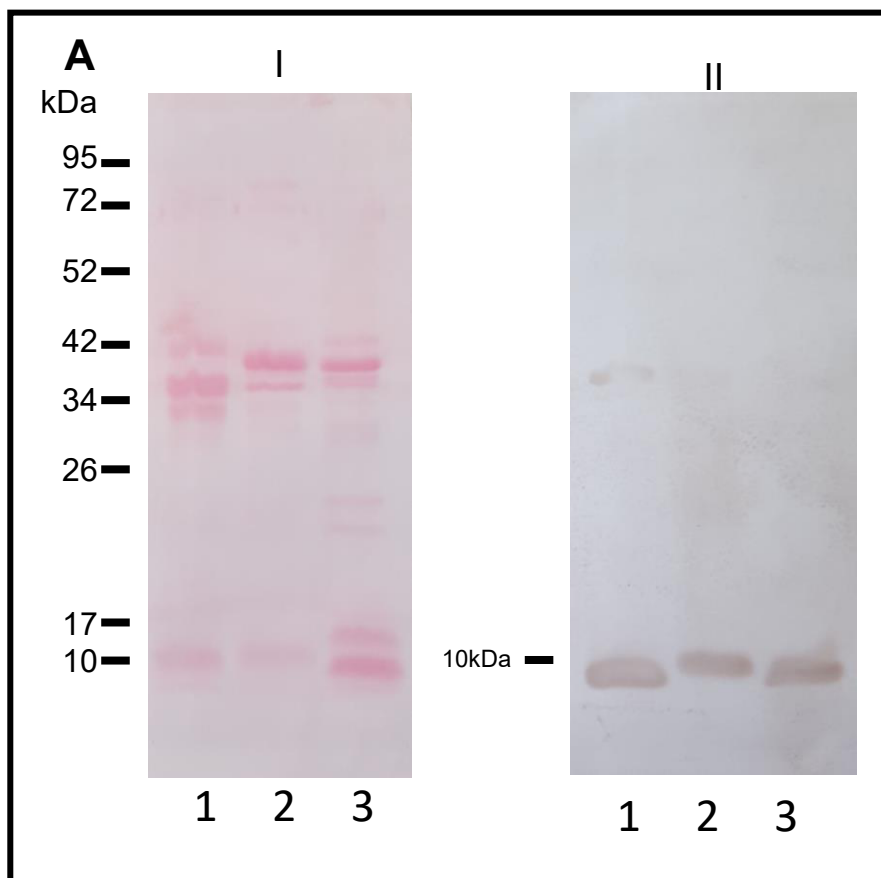


Figura 11: Perfil eletroforético da reatividade do mAb12P frente aos venenos loxoscélicos.

Veneno total (5ug/canaleta) de *L. intermedia* (canaleta 1), *L. gaucho* (canaleta 2) e *L. laeta* (canaleta 3) foi resolvido em gel SDS-PAGE (12,5% de acrilamida, m/v), transferido para membrana de nitrocelulose 0,45 µm e incubados com 20 µg/mL de mAb12. Membrana pós transferência foi corada com corante *Ponceau* para evidenciar a presença das bandas proteicas do veneno total (AI). Imunocomplexo marcado com peroxidase conjugada com anticorpo foi corado com reagentes cromogênicos, dab-cloronaftol (10 minutos de exposição) (AII).

Fonte: Acervo Pessoal.

Atualmente a ferramenta utilizada para a neutralização dos componentes nocivos dos venenos loxoscélicos são anticorpos policlonais de origem equina (Laustsen, et al., 2016). Em torno de um quinto desses anticorpos são direcionados para o veneno dos quais uma pequena parcela apresentará propriedades neutralizantes de afinidades diversas (Alvarenga, et al., 2014). A produção de um anticorpo monoclonal que possa ser selecionado quanto a especificidade e afinidade conduziu grupos de pesquisas a gerarem e caracterizarem anticorpos monoclonais de origem murino contra as proteínas loxoscélicas: LimAb7 (Alvarenga, et al., 2003) e LiD1mAb16 (Dias-Lopez, et al., 2014). Ambos monoclonais neutralizam a atividade dermonecrótica; apesar do LimAb7 ter sido produzido apenas contra o veneno de *L. intermedia* (Alvarenga, et al., 2003); enquanto o antígeno do LiD1mAb16 foram as esfingomielinases-D de *L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta* (Dias-Lopez, et al., 2014).

No entanto, o mAb12 é o primeiro anticorpo monoclonal produzido a partir do veneno de *L. intermedia*, *L. gauch*o e *L. laeta* que reconhece proteínas de baixa massa e apresenta potencial tanto no rastreamento do alvo quanto no estudo desses componentes, que até o momento não foram amplamente investigados.

4.2 NEUTRALIZAÇÃO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE VENENO

L. INTERMEDIA PELO MAB12

O veneno de *L. intermedia*, assim como outros do gênero *Loxosceles*, desencadeiam a hemólise na ausência de complemento (Chaves-Moreira, et al., 2009). E por ser uma das complicações mais severas do envenenamento, antivenenos são desenvolvidos a fim de neutralizar esta atividade hemolítica. O mAb12 apresentou potencial de neutralização dos efeitos hemolíticos do veneno da aranha *L. intermedia* (Figura 12), que é a espécie mais frequente nos acidentes loxoscélicos no Brasil. Este comportamento pode ser decorrência do reconhecimento cruzado das fosfolipases pelo mAb12 ou um possível efeito sinérgico existente entre o alvo do mAb12 e demais toxinas dermonecróticas. Bustillo, et al., (2012) observaram sinergismo entre duas proteínas do veneno da serpente *Bothrops alternatus*, no qual a proteína altamente expressa (fosfolipases A₂ - PLA₂) não apresentava citotoxicidade sozinha mas intensificava o efeito nocivo da proteína tóxica. Por consequência, ao inibir a ação da proteína PLA₂ com anticorpo específico, 50 µg/mL de veneno foi incapaz de causar os efeitos citotóxicos característicos (Bustillo, et al., 2012).

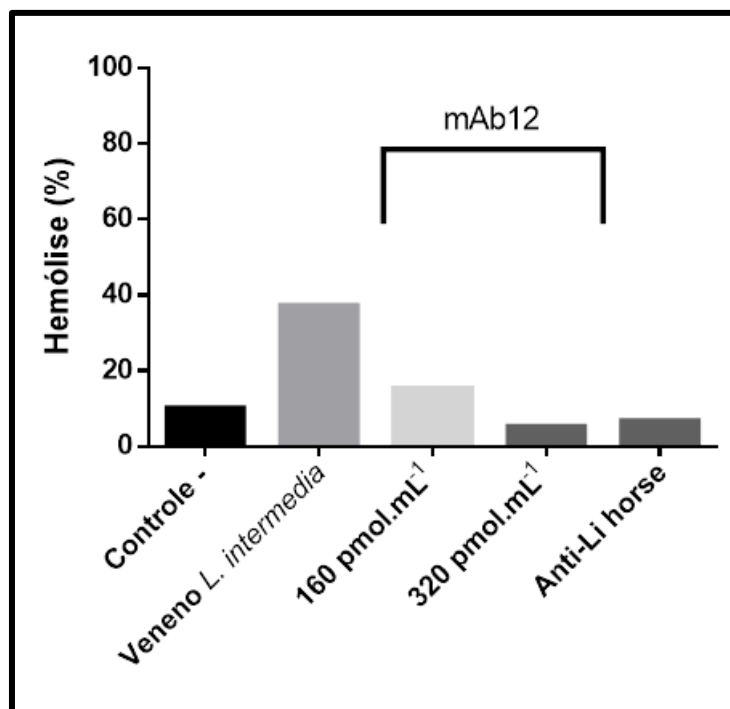


Figura 12: Porcentagem de inibição da hemólise de veneno *L. intermedia* pelo mAb12.

Eritrócitos humanos (10^8 células) foram incubados com veneno de *L. intermedia*, previamente incubado sozinho e com diferentes concentrações molares de mAb12 (160 e 320 pmol.mL⁻¹) por 1 hora e meia a 37°C. Em seguida, adicionou-se as hemácias e incubou-se por 24 horas a 37°C sob suave agitação. Para o controle negativo usou tampão TBS e como controle de neutralização por anticorpo foi utilizado anticorpo policlonal de cavalo (anti- *Li horse*, 320 pmol.mL⁻¹). Ensaio foi realizado em duplicata e porcentagem de hemólise calculado com base nos valores de absorbância lida a 570nm, sendo controle positivo (Triton-X 100) determinado como 100% de lise.

Fonte: Acervo pessoal.

O emprego de anticorpo monoclonal murino e seus fragmentos recombinantes foi apontado por autores com uma alternativa viável para os soros anti-loxoscélicos (Alvarenga, et al., 2014; Laustsen, et al., 2016). O mAb12 foi capaz de neutralizar a hemólise a 320 pmol de forma similar ao anti-*Li horse* (Figura 10). Por isso, poderia ser empregado juntamente com outros anticorpos monoclonais como alternativa mais específica ao tratamento do loxoscelismo. Na literatura há descrito alguns anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpo recombinante com potencial de neutralização (Alvarenga, et al., 2003; Dias-Lopez, et al., 2014; Karim-Silva, et al., 2016). No entanto, não há nenhum capaz de também reconhecer toxinas de baixa massa, Isso aumenta o interesse do uso do mAb12 na investigação e no entendimento do papel desses componentes no contexto do envenenamento.

4.3 ISOLAMENTO DO ANTÍGENO ALVO

Realizou-se técnicas de imunoprecipitação e espectrometria de massa para isolamento e identificação do antígeno alvo. Em um primeiro momento foi purificado

veneno *L. gaucho* em coluna de *Sepharose 4B* previamente conjugada ao mAb12 para obtenção do antígeno específico do anticorpo. Amostras foram resolvidas por eletroforese a fim de analisar e caracterizar a proteína purificada quanto a sua massa molecular (Figura 13).

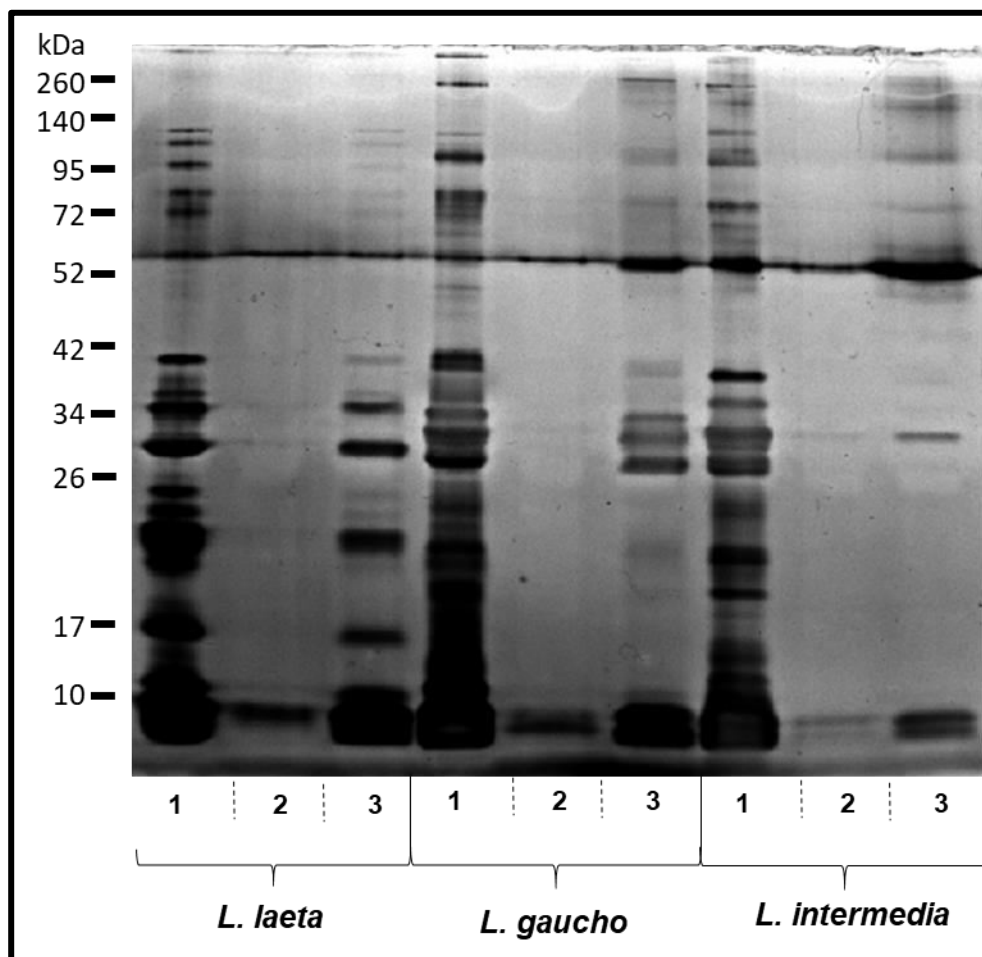


Figura 13: Perfil eletroforético da proteína purificada em coluna de mAb12.

Eletroforese em gel SDS-PAGE (15%, m/v) de 0,6 µg/mL do veneno total (1), 0,3 µg/mL de proteína ligante (2) e proteína não-ligante (3) foi analisado após a coloração com nitrato de prata. MW: marcador de massa molecular.

Fonte: Acervo Pessoal.

As amostras purificadas da coluna de mAb12 foram extraídas do gel na faixa de 10 kDa e submetidas a técnica de espectrometria massa com o intuito de identificar a proteína ligadora do anticorpo monoclonal.

Para a interpretação dos dados gerados pelo algoritmo do software *Peaks* consideraram-se os seguintes critérios:

- presença de até 2 peptídeos únicos (número de sequências peptídicas que são únicas para um grupo proteico);
- intensidade do pico maior ou igual a 1×10^8 (peptídeos mais intensos da amostra);
- valor de cobertura (percentagem da sequência proteica revestida pelos peptídeos identificados);
- massa molecular em torno de 10kDa (de acordo com banda observada no gel SD-PAGE);
- descrição da proteína identificada no banco de dados (probabilidade de ser encontrada na amostra analisada).

Com base nestes critérios (Tabela 10) foi identificada a proteína LiTx1, uma notina do veneno de *L. intermedia*, que possui carbamidometilação e carboximetilo como modificações pós-traducionais. Os peptídeos identificados que contém no máximo dois peptídeos únicos estão ilustrados na Tabela 11 assim como a sequência proteica da notina com as sequências peptídicas (em destaque)

Descrição	Acesso	MM(Da) média	Peptídeo único	Cobertura (%)	Área
LiTx1 [<i>Loxosceles intermedia</i>] ou U1-sicaritoxin-Li1a	AAT85610.1 sp Q6B4T5.1 TX1_LOXIN AY681975.1	11.214	2	23	1.66E7 2.17E6 7.11E6

encontradas na análise.

Tabela 10: Resumo dos critérios utilizados para seleção da proteína identificada por espectrometria de massa.

Fonte: Acervo Pessoal.

Peptídeos identificados		Cobertura (%)
<u>K.GCATKPDDWCCK.N</u>	<u>K.CPAWSSSTSECR.C</u>	23
R.VLITTDILAR.G		21
R.YRPGTVALR.E	R.YRPGTVALR.D	13
R.AGLQFPVGR.I	AGLQFPVGR.I	9
R.STDYGIFQINSR.Y		8
Sequência proteica		
MRFLVGAVLVVVLVACATAFESDAETFKSLVVEERKCHGDGS KGCATKPDDWCCKN TPCKCPAW SSTSECR CAMDCSRRCKGKRALLLPVETHRLLFPEQW		

Tabela 11: Sequência dos peptídeos identificados e proteína selecionada a partir dos peptídeos.

Fonte: Acervo Pessoal.

Apesar do veneno purificado ser da espécie *L. gaucho*, a análise da espectrometria de massa identificou a proteína do veneno *L. intermedia*, decorrente

dos dados presentes no banco de pesquisa utilizado. Com base no trabalho de Matsubara, *et al.*, (2017) constatou-se a existência da mesma proteína (100% de identidade) no veneno das duas espécies (Tabela 12). Além disso, também é possível sugerir a sequência aminoacídica da notina de *L. laeta* reconhecida pelo mAb12. A similaridade estrutural entre estas proteínas nos venenos do gênero *Loxosceles* poderia justificar a capacidade do monoclonal em reconhecer três espécies distintas.

Toxina	Espécie	Sequência de aminoácidos	Identidade (%)	Referência
LiTx1	<i>L. intermedia</i>	KCHGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDQCSRCK	-	De Castro et al., 2004
LiTx1c	<i>L. laeta</i>	KCHGDGSKGCATKPDDWCCKNTPCKCPAWSSTSECRCAMDQCSRCK	100	De Castro et al., 2004
LgTx1a	<i>L. gaucho</i>	ACHGDGSKGCATQPDWCCKKTPCKCPAWSSTSECRCQAQCSRSCR	93	Matsubara et al., 2017
Legenda: cor preta=resíduos conservados; cor azul=motivo também presente fosfolipases; C=resíduo de cisteína conservado				

Tabela 12: Sequência de aminoácidos da LiTx1 e sequência ortólogas de *L. laeta* e *L. gaucho* com maior porcentagem de identidade.

Fonte: Adaptado de Matsubara *et al.*, 2017.

4.4 SEQUÊNCIA DA CADEIA VARIÁVEL PESADA E LEVE

Para conhecer a região do anticorpo responsável pela interação com o alvo é necessário o sequenciamento das regiões variáveis de cadeia leve e pesada. Para isso foi realizada a extração de *RNA* total do hibridoma secretor de mAb12. O produto de *RT-PCR* foi empregado em *PCR*, na qual foram utilizados *primers* específicos. A amplificação específica foi confirmada pela visualização de uma banda de aproximadamente 350 pb que corresponde à cadeia *VL* e uma de 400 pb a *VH* em gel de agarose (Figura 14A). Após a amplificação do material genético de *VH* e *VL* em bactérias *E. Coli* (cepa TG1), realizou-se o sequenciamento das cadeias variáveis. Os dados obtidos no sequenciamento foram analisados na ferramenta interativa IMGT (do inglês *ImMunoGeneTics*) para análise quanto a homologia com outros anticorpos murinos e modelagem da estrutura secundária das cadeias variáveis (colar de pérolas) (Figura 14B). Com base nestas informações foi constatado que a sequência da cadeia variável pesada apresenta 97,57% de similaridade com a sequência murina *Musmus_IGHV14-4*02_F*, enquanto a sequência da cadeia variável leve possui 97,62% de similaridade com a sequência murina *Musmus_IGKV1-117*01_F*. A estrutura secundária permitiu confirmar a

presença de resíduos conservados das cadeias variáveis: cisteína na posição 23º, triptofano na 41º, aminoácido hidrofóbico na 89º, cisteína 104º e fenilalanina ou triptofano na 118º (Fields, et al., 2013).

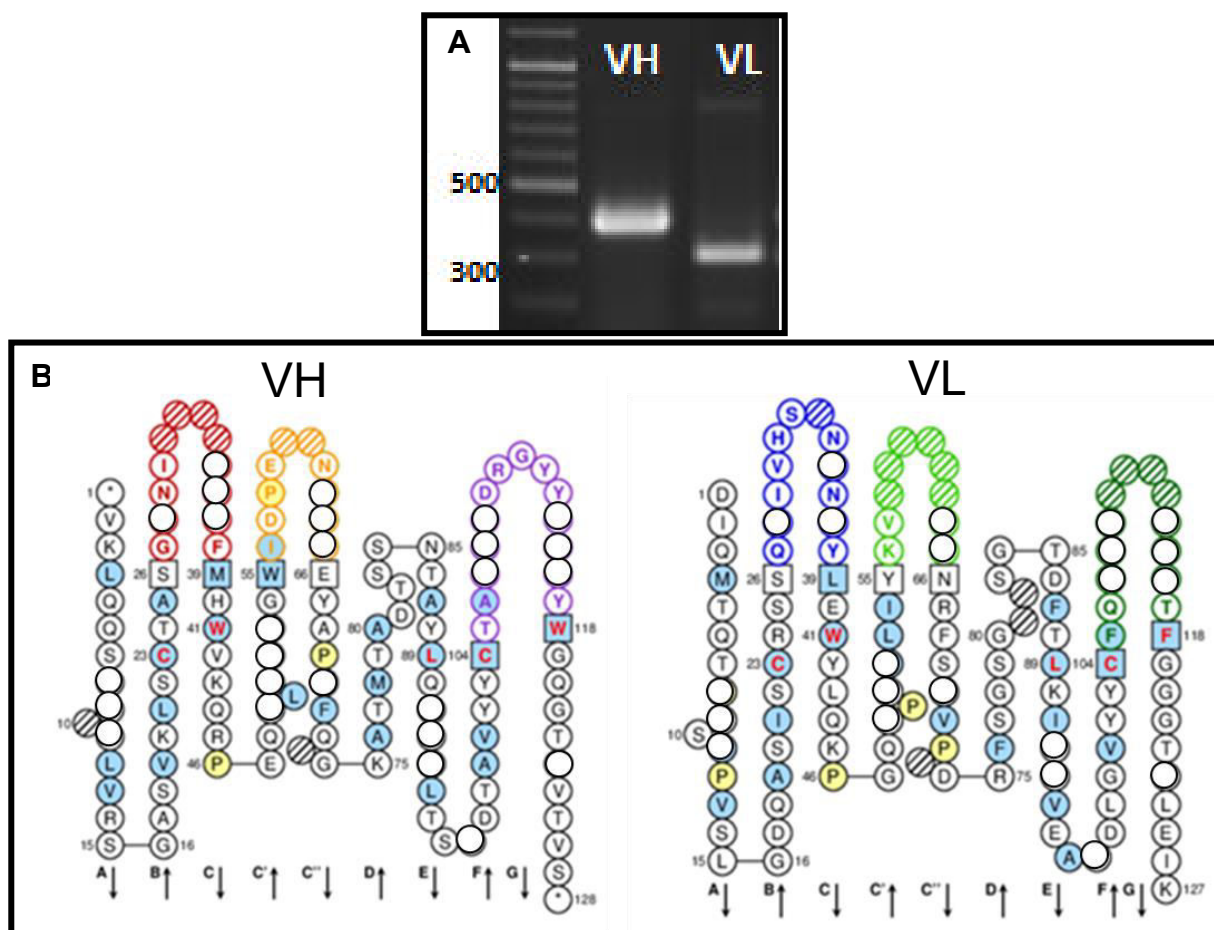


Figura 14: Fração variável do anticorpo monoclonal – mAb12.

Eletoforese em gel de agarose (1%, m/v) dos cDNAs codificantes da cadeia variável leve (VL) e cadeia variável pesada (VH) do anticorpo com aproximadamente 350 pb e 400 pb, respectivamente (A). Representação da sequência de aminoácidos da cadeia variável pesada e leve do anticorpo em formato de colar de pérolas, no qual é possível visualizar a disposição dos aminoácidos na estrutura e caracterizar região CDR, pontes dissulfeto, folhas β antiparalelas (B).

Fonte: Acervo Pessoal.

4.5 DESIGN DO GENE SINTÉTICO

O fragmento Fv foi projetado de forma que a proteína recombinante apresentasse duas formas moleculares contendo os domínios variáveis de cadeia leve e pesada. O primeiro, denominado scFv12P, possui conector de 15 aminoácidos (Gly_4Ser)₃. E o segundo, diabody12P, é constituído de dois scFvs com conector de 5 aminoácidos (Gly_4Ser).

Em um primeiro momento optou-se por expressar e caracterizar o fragmento recombinante scFv12P, visando a sua aplicação como agente neutralizador dos efeitos hemolíticos do veneno no sangue periférico. Esta propriedade foi observada com a molécula inteira de mAb12. No entanto, o scFv12P foi incapaz de evitar a hemólise. Dessa forma, seguiu-se para construção do fragmento recombinante diabody12P, pois em trabalhos anteriores do grupo foi obtido maior sucesso com o fragmento de anticorpo recombinante neste formato (Karim-Silva, et al., 2016).

Para o segundo formato, o gene sintético foi remodelado em um fragmento Fv com conector de 5 aminoácidos. A confirmação da construção correta do fragmento recombinante diabody12P foi feita através de gel de agarose (Figura 15A e 15B) e do sequenciamento do material genético obtido das colônias de *E. coli* positivas para o psW1+diabody12P (Figura 15C). A modificação do tamanho do conector, através de ferramentas básicas da engenharia genética, permite a expressão de fragmentos recombinantes formados de duas (*diabody*), três (*triabody*) e até quatro (*tretabody*) frações Fv. Esses oligômeros possuem a vantagem de apresentar maior avidéz pelo antígeno conforme maior o número de scFvs na molécula (Fields, et al., 2013).

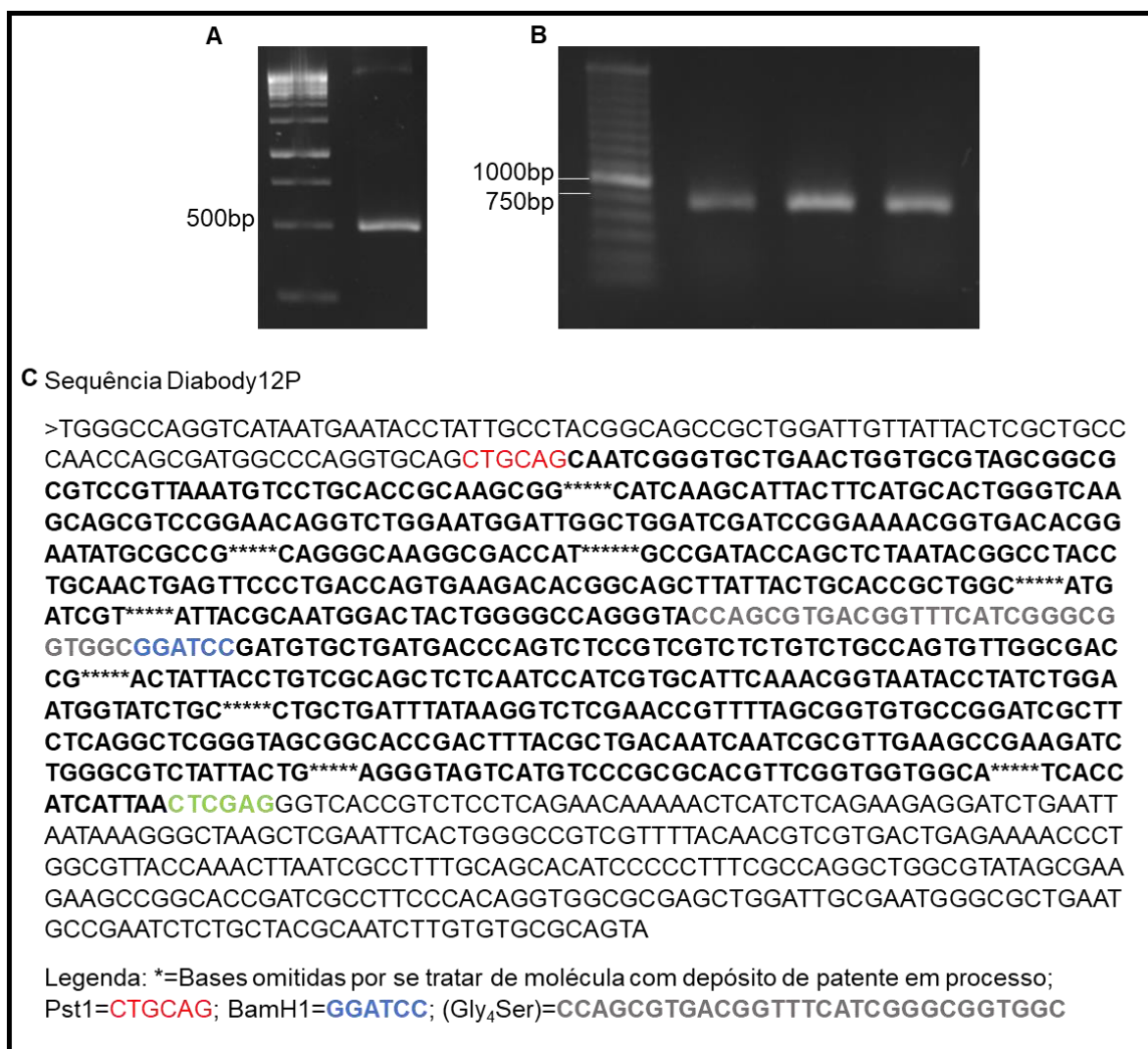


Figura 15: Fragmento recombinante diabody12P.

Eletroforese em gel de agarose (1,5%, m/v) dos clones da sequência VH+conector(Gly₄Ser) (A). Eletroforese em gel de agarose (1,5%, m/v) dos clones das colônias positivas para o plasmídeo psW1+diabody12P (B). Resultado da sequência genética do fragmento diabody12P, destacando as enzimas de restrição, VH, VL e conector (Gly₄Ser) (C).

Fonte: Acervo Pessoal.

4.6 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE

Ambos fragmentos da Fv foram expressos em cepa HB215 de *E. coli* em meio 2XTY (Fields, et al., 2013). A purificação foi feita por diferentes estratégias de cromatografia de afinidade a fim de avaliar qual produziria o maior rendimento. Após obter o extrato periplasmático por choque osmótico realizou-se a purificação do fragmento recombinante diabody12P por coluna *IMAC* (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) com níquel agarose ou coluna de proteína L agarose. Quando

realizado na bancada (manual) o rendimento da coluna IMAC foi de ~20 µg/L; enquanto no sistema de cromatografia *AKTA start* rendeu ~100 µg/L; já quando purificado com proteína L agarose obteve-se ~ 80 µg/L. No caso do fragmento recombinante scFv12P a purificação foi apenas por níquel agarose (manual) e resultou em rendimento de 5 mg/L. O aspecto das amostras purificadas foi visualizado por eletroforese e a confirmação da produção das moléculas recombinantes funcionais por ensaio de *Western blotting* (Figura 16).

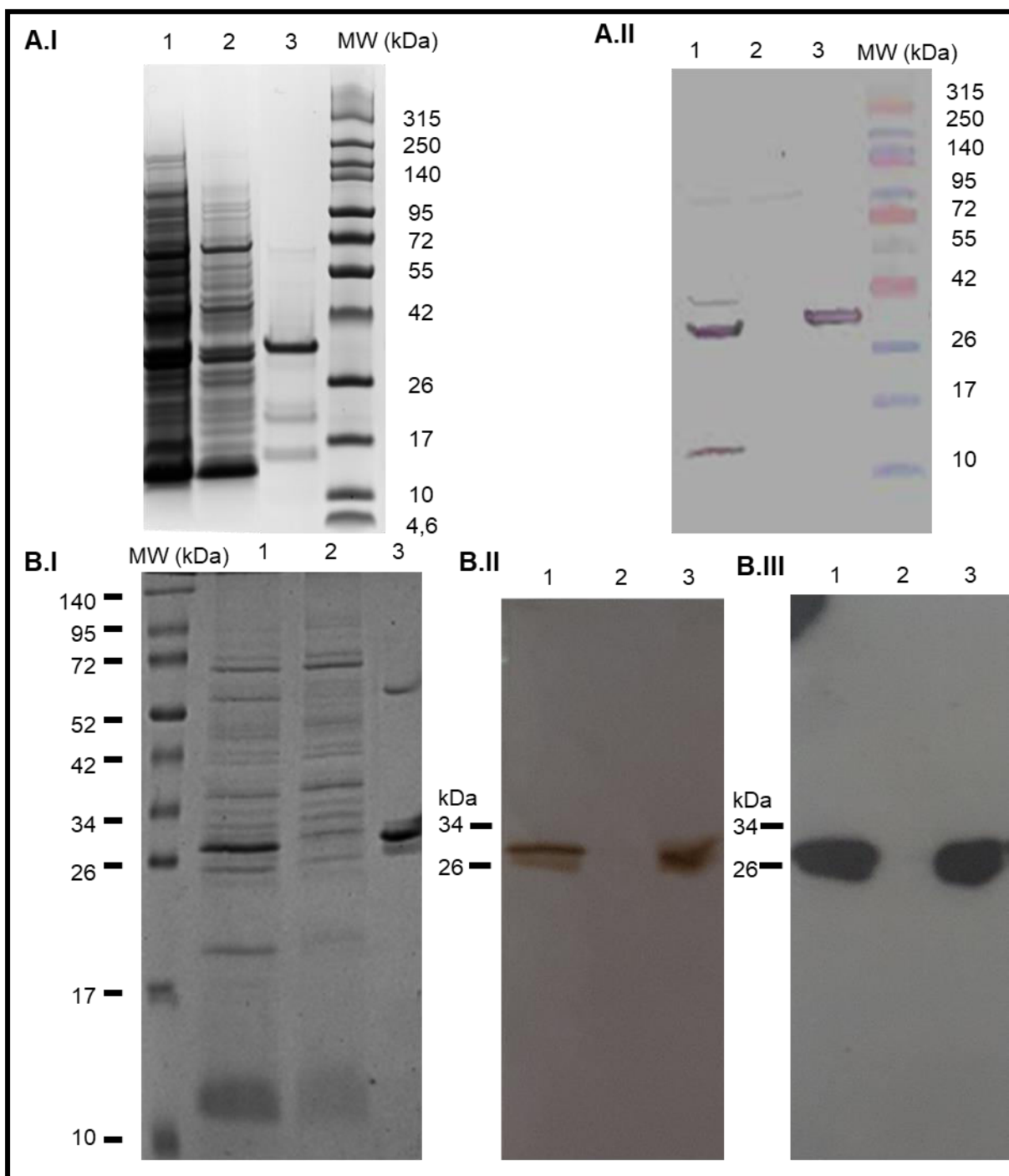


Figura 16: Análise da expressão e purificação dos fragmentos recombinantes scFv12P (A) e diabody12P (B).

Elektroforese em gel SDS-PAGE (12%, m/v) do extrato periplasmático (1), proteína não-ligante (2) e fragmento recombinante purificado (3) foi analisado após a coloração de *Coomassie blue* (A.I e B.I). Formação do imunocomplexos em membrana de nitrocelulose foi revelado com peroxidase conjugada a histidina (scFv12P) ou proteína L (diabody12P) e reagentes DAB-cloronaftol (A.II e B.II) ou luminol (exposição 5 min, B.III). MW: marcador de massa molecular.

Fonte: Acervo Pessoal.

Os principais critérios para a escolha do modo de captura da proteína recombinante são o alto rendimento e pureza da purificação. Pensando nisso, neste trabalho foram testados dois marcadores do fragmento recombinante: cauda de

poli-histidina e sítio de interação com proteína L. Ambos marcadores purificam a proteína por cromatografia de afinidade, diferenciando-se pela forma de ligação com o fragmento recombinante.

Extensamente utilizada na purificação de fragmentos recombinantes, a cauda de histidina geralmente não afeta a estrutura ou função da proteína a qual está ligada devido a seu pequeno tamanho e ausência de carga em pH fisiológico (Spriestersbach, et al., 2014). No entanto, por tratar-se de uma sequência aminoacídica a mais na molécula tais empecilhos são propícios de acontecer. A detecção por proteína L eliminam as desvantagens atribuídas a caudas ligantes por interagir com a região *FR1* da cadeia *VL* do tipo *kappa* sem interferir com a interação antígeno–anticorpo (Rodrigo, et al., 2015).

Considerando esses pontos, é possível observar que ao utilizar proteína L foi obtida uma maior quantidade do fragmento recombinante quando comparado com a purificação por cauda de histidina. Das, *et al.*, (2005) ao avaliar os mesmo dois meios de purificação obtiveram similar resultado. Dessa forma, o emprego da proteína L constitui um simples e eficiente método de detecção e purificação de fragmentes recombinantes, como postulado por Muzard, *et al.*, (2009). A purificação automatizada oferece uma atmosfera de execução do experimento controlada por parâmetros mensuráveis e plausíveis de análise e reajustes (Madadlou, et al., 2017), o que consequentemente resulta em um maior rendimento quando comparado a purificação manual, isto foi constatado na purificação do diabody12P.

4.7 CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO FRAGMENTO DE ANTICORPO RECOMBINANTE

Para caracterização imunoquímica dos fragmentos recombinantes scFv12P e diabody12P empregou-se as técnicas de imunodetecção *ELISA* indireto e *Western blotting*. Na confirmação da reatividade dos fragmentos recombinantes scFv12P e diabody12P frente aos venenos das três espécies de *Loxocles sp.* utilizou-se um teste de *ELISA* indireto. Ambos fragmentos recombinantes apresentaram reatividade dose dependente frente aos três venenos e na mesma ordem de intensidade de reconhecimento que o mAb12 (*L. gauchoi*, *L. intermedia* e *L. laeta*) (Figura 17). No entanto, quando comparado os dois fragmentos recombinantes em cada forma de

detecção, os resultados foram contraditórios. O scFv12P apresentou reatividade similar ao diabody12P quando revelados com proteína L (Figura 17A). Já quando os fragmentos recombinantes foram detectados pela cauda de histidina o diabody12P obteve maior intensidade reativa que o scFv12P (Figura 17B), condizendo proporcionalmente com a quantidade de marcador por molécula: diabody é um dímero de scFv, ou seja, possui duas caudas de histidina, enquanto o scFv tem apenas uma (Filpula, 2007; Young, et al., 2017).

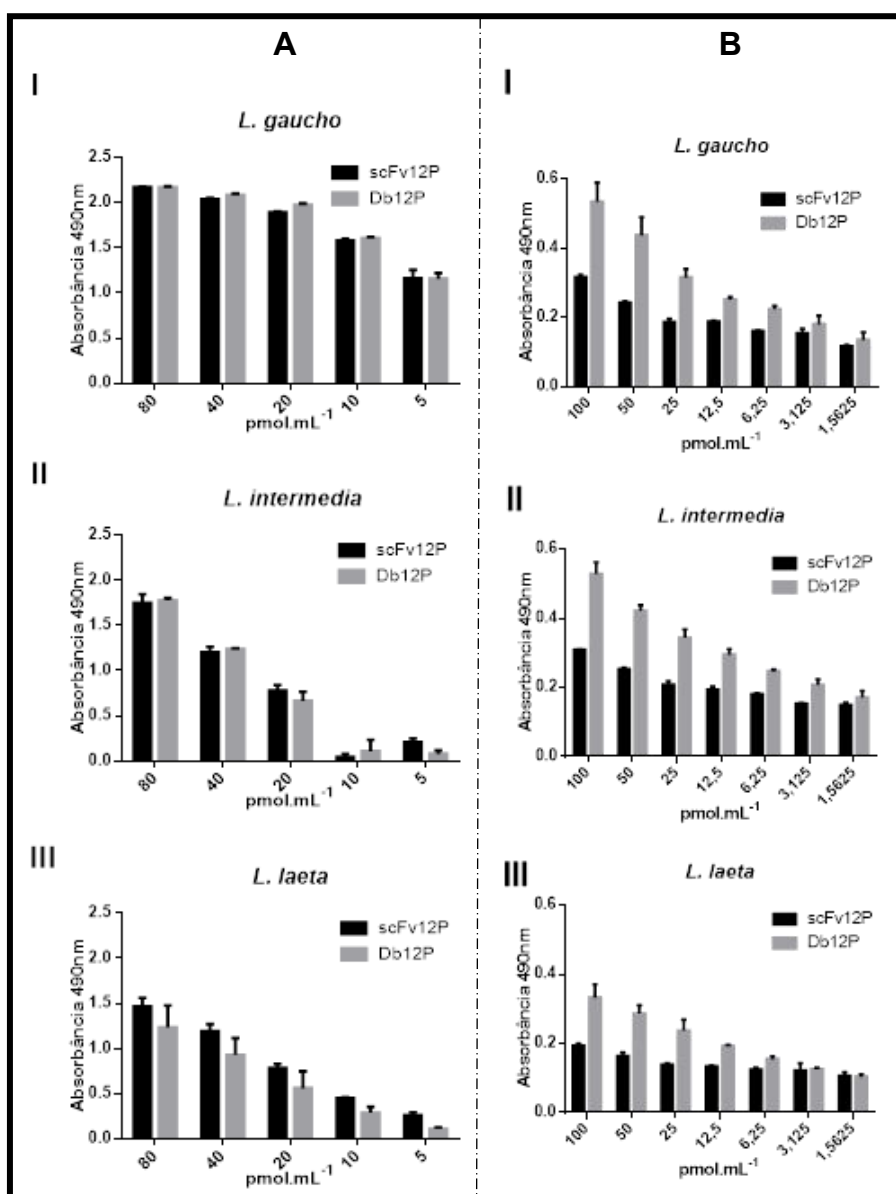


Figura 17: Comparação da reatividade entre os fragmentos recombinantes frente cada veneno de *Loxoceles* sp.

Placas de *ELISA* foram adsorvidas com 2,5 µg/mL veneno *L. gaucho* (I), *L. intermedia* (II) ou *L. laeta* (III) e incubados com diferentes concentrações de fragmentos de anticorpo recombinante. Imunocomplexos foram detectados com peroxidase conjugado a proteína L (A) ou anti-anti-histidina

(B) e substrato OPD. A reatividade de scFv12P e diabody12P foi comparada pelo número de moléculas (pmol) frente aos venenos. Valores observados são a média das duplicatas após descontado o controle negativo (veneno, proteína L-HRP, anti-histidina, anti-mouse-HRP).

Fonte: Acervo Pessoal.

Ao analisar os dois métodos de detecção dos fragmentos recombinantes percebe-se uma grande diferença nos valores de reatividade entre quantidades similares de fragmento recombinante (Figura 17). Tais diferenças são decorrência das características de cada marcador utilizado. A proteína L interage com apenas um sítio na molécula de scFv (Rodrigo, et al., 2015). Para outro lado, a cauda de histidina é detectada por anticorpo anti-histidina que é capaz de se ligar a duas caudas por vez, possuindo assim uma maior averse pelo alvo (Schroeder & Cavacini, 2010). Dessa forma, torna-se inviável a comparação entre as duas formas de detecção nestes ensaios. Entretanto, a detecção por proteína L é teoricamente um método mais sensível.

O padrão de reconhecimento dos venenos de *Loxosceles* pelos fragmentos recombinantes conservou o mesmo observado pelo mAb12 (Figura 18). Dessa forma, as alterações estruturais realizadas não afetaram drasticamente as interações antígeno-anticorpo. No entanto, a reatividade cruzada apresentada pelo mAb12 não permaneceu nos fragmentos do anticorpo recombinante. O tamanho reduzido das moléculas pode ter modificado as forças de interações. Por consequência, eliminou o reconhecimento inespecífico do anticorpo, que em parte é ocasionado pelas ligações não específicas presentes em torno do sítio de ligação com o antígeno, influenciando a cinética e equilíbrio de distribuição das forças eletroquímicas (Leckband, 2000). A confirmação da perda de afinidade poderia ser confirmada por SPR - *Surface plasmon resonance* - (Karim-Silva, et al., 2016). Ainda disso, a importância de cada aminoácido poderia ser averiguado por cristalografia do anticorpo inteiro ou do fragmento recombinante com o alvo (Abbott, et al., 2014).

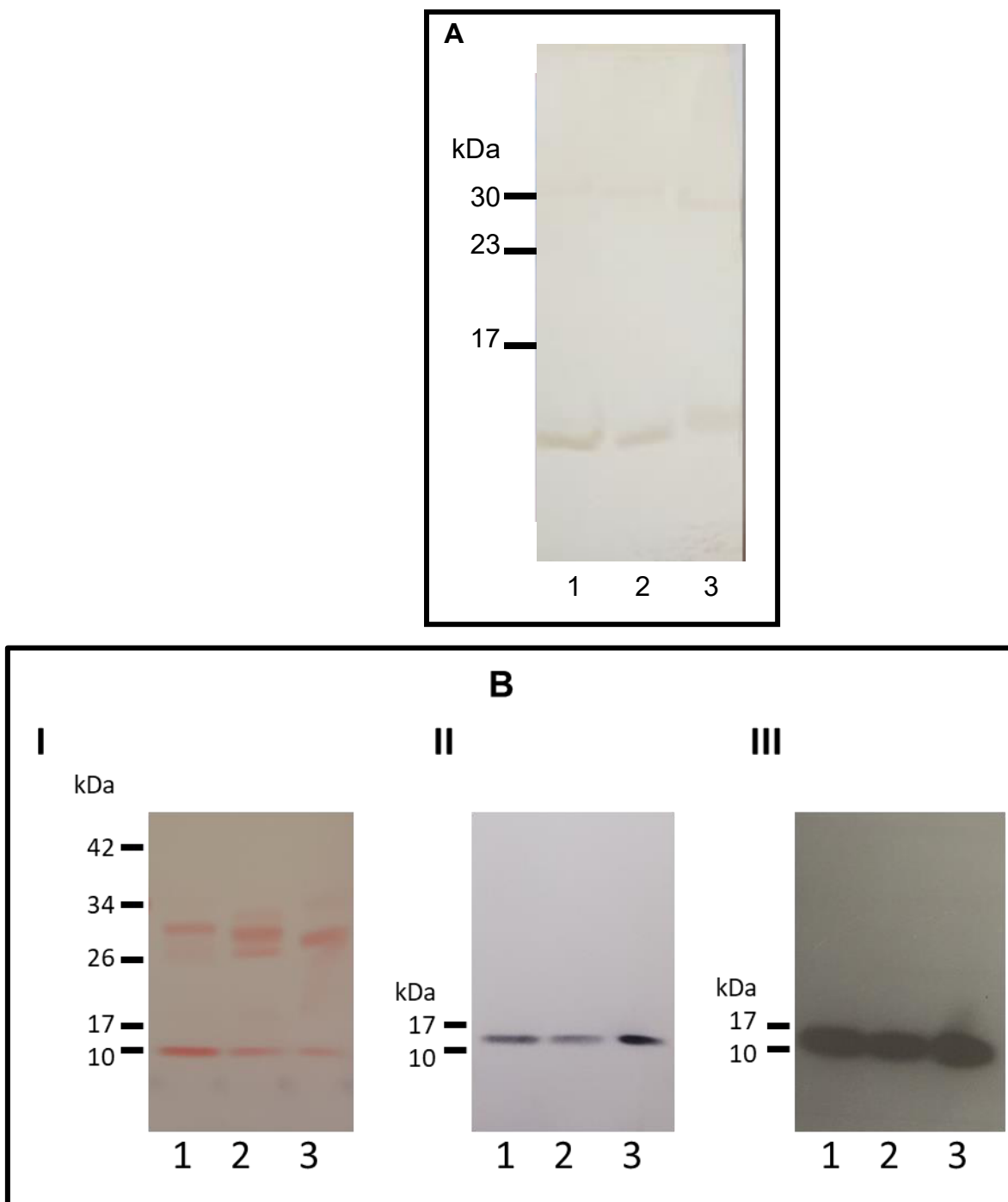


Figura 18: Análise por Western blot do scFv12P (A) e diabody12P (B) frente aos venenos.

Veneno total (5 µg/canaleta) de *L. intermedia* (canaleta 1), *L. gaucho* (canaleta 2) e *L. laeta* (canaleta 3) foi resolvido em gel SDS-PAGE (12,5% de acrilamida, m/v), transferido para membrana de nitrocelulose 0,45µm e incubados com 50 µg/mL de scFv12P (A) ou extrato periplasmático do diabodya12P (B). Membrana pós transferência foi corada com *Ponceau* para evidenciar a presença das bandas proteicas do veneno total (I). Imunocomplexos formados na membrana foram marcados com peroxidase conjugada com proteína L foi corado com reagentes cromogênicos, dab-cloronaftol - 10 minutos de exposição - (A e BII). ou luminol - 5 minutos de exposição - (BIII). Membrana de nitrocelulose (B) foi previamente testada para interação inespecíficas com extrato periplasmático de *E. coli* HB2151 sem inserto.

Fonte: Acervo Pessoal.

4.8 ELISA DE COMPETIÇÃO

Padronizou-se um *ELISA* de competição, no qual os venenos imobilizados competiam pelos os venenos das três espécies de *Loxosceles* livres em solução. Busca-se com esse teste e o emprego do fragmento de anticorpo recombinante como uma ferramenta de diagnóstico para acidentes com a peçonhenta. O marcador do fragmento recombinante escolhido foi a proteína L por este já estar conjugado a peroxidase, limitando, assim, o teste a três etapas de incubação. Com este critério estabelecido optou-se por utilizar o scFv12P devido aos resultados observados nos *ELISAs* indiretos. Neste ensaio não foi utilizado soro humano pois a proteína L reage com componentes do soro. No entanto, o fragmento recombinante mostrou-se capaz de detectar concentrações muito pequenas de veneno em solução (Figura 19). Esta alta sensibilidade justifica o possível uso do fragmento recombinante como um instrumento de detecção de toxinas circulante no sangue. Dessa forma, modificações no anticorpo recombinante como inserção de um marcador colorimétrico tornariam o ensaio mais rápido e possível de executar com soro humano. Tal configuração já foi efetivamente caracterizada em um ensaio de detecção de veneno circulante no soro humano, no qual o anticorpo recombinante foi conjugado a fosfatase alcalina (Jiacomini, et al., 2016). A detecção do fragmento recombinante por anti-histidina adicionava mais uma etapa pela adição do anticorpo comercial anti-mouse e isso pode ter interferido na sensibilidade do ensaio.

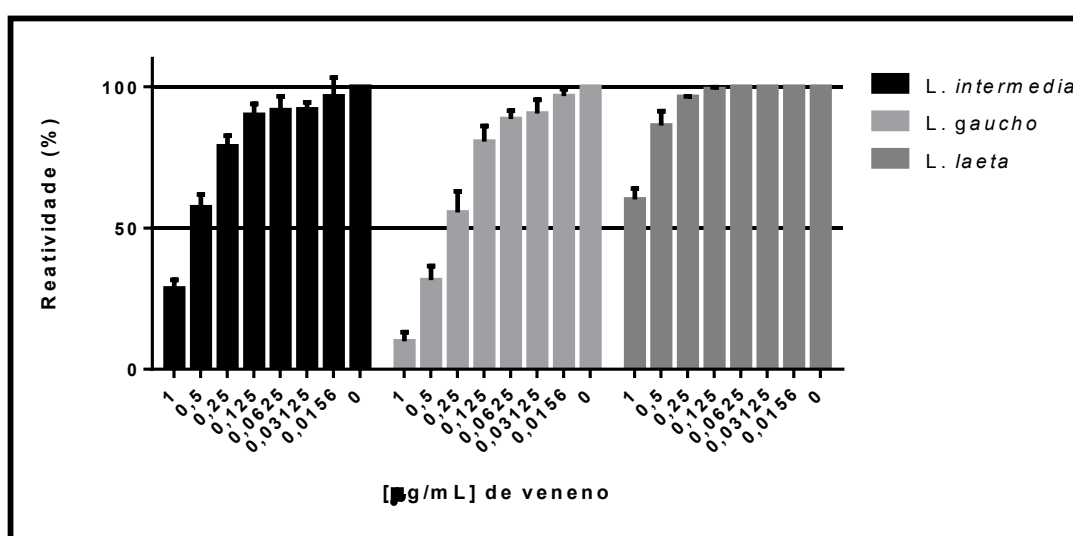


Figura 19: Competição entre veneno em solução e imobilizado.

Placas de *ELISA* foram adsorvidas com 5 μg/mL veneno *L. gaucho*, *L. intermedia* ou *L. laeta* e incubados com diferentes concentrações de scFv12P (0,015 μg/mL) e diferentes concentrações de

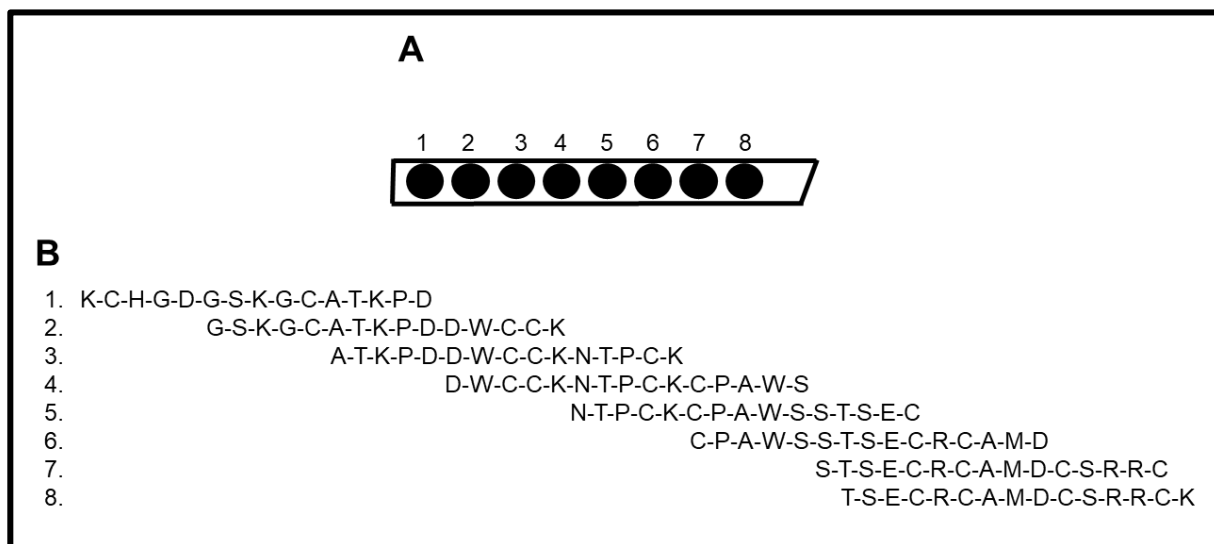
veneno (1-0,0156 µg/mL). Formação do imunocomplexos - scFv12P e veneno adsorvido na placa - foram detectados com peroxidase conjugado a proteína L e substrato OPD. Valores observados são a média das duplicatas após descontado o controle negativo (veneno, proteína L-HRP).

Fonte: Acervo Pessoal.

4.9 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS

A identificação de epítomos específicos pelo método de *spot synthesis* pode oferecer informações interessantes sobre o perfil de reconhecimento antigênico. Oferece, assim, uma caracterização imunoquímica mais detalhada do anticorpo por permitir determinar a sequência de aminoácidos linear que interage com o anticorpo monoclonal. Além disso, análises *in silico* permitem uma visão a nível molecular das similaridades entre componentes dos três venenos de *Loxocles*, possibilitando identificar epítomos compartilhados entre as proteínas que justifiquem a reatividade cruzada do monoclonal.

Com os dados obtidos pela técnica EM, sintetizou-se em uma membrana de celulose 8 peptídeos cada uma com 15 aminoácidos (Figura 20) de maneira a cobrir



a sequência referente à notina LiTx1 de *L. intermedia* (de Castro, et al., 2004)

Figura 20: Sequência dos peptídeos de 15 aminoácidos sintetizados pela técnica de Spot synthesis.

Ilustração da membrana de celulose contendo os 8 peptídeos que cobrem a sequência de aminoácidos da proteína LiTx1 do veneno *L. intermedia* (A). Representação esquemática de aminoácidos dos tetradecapeptídeo (B), sobrepostos por dez resíduos e adicionando 4 aminoácidos inéditos.

Fonte: Acervo pessoal.

Controles negativo e positivo foram estabelecidos previamente ao teste com o mAb12, descartando a presença de reatividade inespecífica (Figura 21A e 21B) e confirmando integridade da membrana (Figura 21C), respectivamente. Com base na ausência de reatividade obtida é possível especular que, por não reconhecer epítomos lineares da sequência primária do LiTx1 (Figura 21D), o reconhecimento do mAb12 é dado com epítomos conformacionais do alvo (Schroeder & Cavacini, 2010; de Moura, et al., 2011)

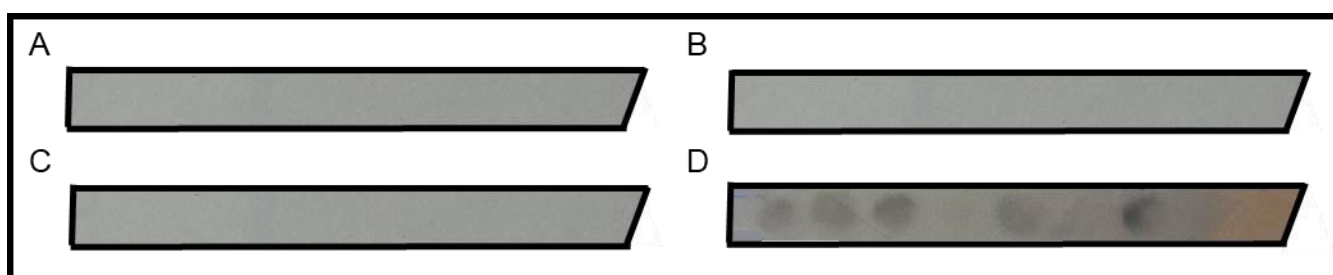


Figura 21: Reatividade dos peptídeos derivados da estrutura primária da notina LiTx1 testado com mAb12.

Oito tetradecapeptídeos (sobrepostos por deslocamento de 4 resíduos) do peptídeo LiTx1 foram previamente testados com os anticorpos conjugados a peroxidase de modo a determinar as diluições não reativas de anti-horse (A) e anti-mouse (B) a membrana. Potencial de reconhecimento dos epítomos pelo mAb12 (100µg/mL) foi testado e marcado com peroxidase conjugada ao anti-mouse e substrato de luminol, quimioluminescência da membrana foi exposição ao filme de revelação por 30 minutos (C). Confirmação da integridade dos *spots* da membrana foi realizada com anticorpos policlonais do soro anti-loxoscélico e marcados com peroxidase conjugado ao anti-horse e substrato luminol, quimioluminescência exposta ao filme por 5 minutos.

Fonte: Acervo Pessoal.

Realizou-se um imunoensaio com a sequência primária das fosfolipases das três espécies reconhecidas pelo mAb12, utilizando uma membrana de celulose contendo duzentos e setenta e oito pentadecapeptídeos que cobrem a sequência de aminoácidos das fosfolipases (de Fernandes-Pedrosa, et al., 2002; Kalapothakis, et al., 2002; Silvestre, et al., 2005). Assim como observado com a membrana de LiTx1, não houve reatividade do mAb12 frente aos aminoácidos contínuos das fosfolipases (Figura 22), confirmando o caráter conformacional do epítopo.

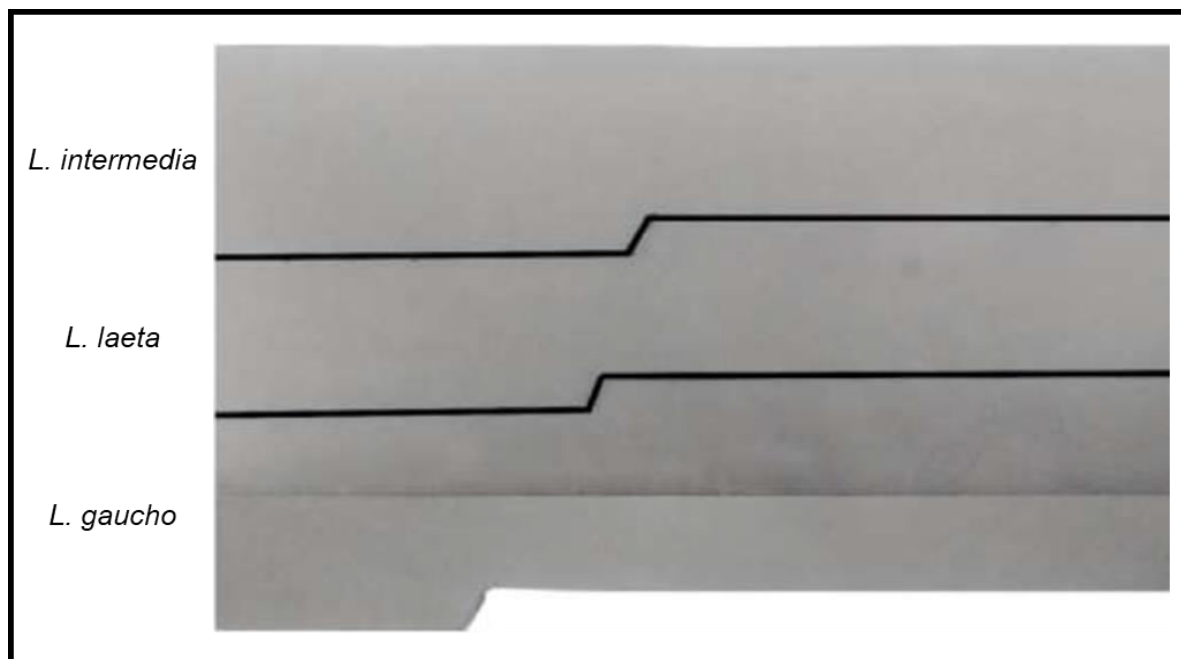


Figura 22: Reatividade dos peptídeos derivados da estrutura primária de três fosfolipases testado com mAb12.

278 pentadecapeptídeos (sobrepostos por deslocamento de 3 resíduos) das fosfolipases foram previamente testados pelo grupo de modo a determinar as diluições não reativas de anti-mouse (dado não mostrado). Potencial de reconhecimento dos epítomos pelo mAb12 (1 µg/mL) foi testado e marcado com peroxidase conjugada ao anti-mouse e substrato de luminol, quimioluminescência da membrana foi exposição ao filme de revelação por 5 minutos.

Fonte: Acervo Pessoal.

O alinhamento da sequência primária de esfingomielinases com notinas forneceu informações quanto as equivalências e similaridades entre os aminoácidos presentes em cada tipo de proteína (Schroeder & Cavacini, 2010). Isso ajuda a fundamentar a reatividade cruzada apresentada pelo anticorpo. A partir das análises *in silico* (Figura 23) supõem-se que os motivos estruturais DCSR e DGSK participem do sítio de interação do mAb12, permitindo que o anticorpo ligue-se a mais de um antígeno. No entanto, outros estudos são necessários para confirmação desse padrão de reconhecimento. Devido a inexistência de reatividade em ensaios com peptídeos lineares, torna-se necessário o emprego de experimentos que avaliem a interação de epítomos conformacionais das duas categorias de proteínas. Através da técnica *phage display*, de Moura et al. (2011) caracterizaram o perfil de reconhecimento de epítomos descontínuos da fosfolipase de *L. intermedia* pelo LimAb7. Este método poderia auxiliar na caracterização do mAb12.



Figura 23: Alinhamento das estruturas primárias de três fosfolipases e três notinas, análise intra e interespecífica de *Loxosceles*.

Semelhança da sequência peptídica entre fosfolipases (LiD1, lix1 ou loxGA_A1H) e notinas (LiTx1, LiTx1c ou LgTx1a) intraespécies foi mensurada quanto a presença de resíduos conservados ou similares (A). Em regiões similares encontradas entre as toxinas foi identificada a sequência tetrapeptídica semelhante entre notinas (B). Estudos de bioinformática foram realizados pelo grupo através do programa Clustal-Omega/EBI-UK.

Fonte: Adaptado de Clustal-Omega/EBI-UK.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer desse projeto a produção e caracterização do anticorpo monoclonal – mAb12 – e seus fragmentos recombinantes – scFv12P e diabody12P – foram desenvolvidas com êxito.

- Os anticorpos mAb12, scFv12P e diabody12P interagem com proteínas de baixa massa sendo a ordem decrescente de reatividade veneno de *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta*. O monoclonal reconhece cruzadamente as fosfolipases do veneno sendo capaz de inibir a hemólise.
- As notinas são o antígeno alvo do mAb12, existindo sequência de homologia ortóloga entre o peptídeo nas três espécies, tendo identidade de 100% entre *L. intermedia* e *L. gaucho*;
- O mAb12 não reconhece epítomos lineares das notinas e fosfolipases. No entanto, o reconhecimento pode ser parcial através de dois motivos

estruturais presentes nas duas classes de proteína, o que também justifica a reatividade cruzada;

- A sequência das regiões variáveis de cadeia pesada e leve do mAb12 foram obtidas e a modificação realizada na região *FR1* da cadeia variável leve permitiu a interação dos fragmentos recombinantes com a proteína L;
- O gene sintético foi expresso como monômero (scFv12P) e dímero (diabody12P) e constatou-se melhores resultados quando purificado e detectado por proteína L do que pela cauda de histidina;
- Os fragmentos recombinantes são capazes de detectar o veneno em solução na ordem de nanogramas, tornando-se um bom biomarcador com potencial aplicação em ensaios de imunodeteção e bioseparação do veneno.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com fragmentos recombinantes devidamente produzidos e caracterizados, seria interessante sua aplicação como ferramenta de inibição da hemólise causada pelo veneno de *Loxosceles*. Tendo em vista o sucesso obtido com mAb12 em ensaios de hemólise, pressupõem-se que o fragmento recombinante também apresentaria mesmo papel. No entanto, seria necessário a aplicação de quantidades maiores da molécula para produzir o mesmo efeito de reatividade cruzada observado com o monoclonal. Os efeitos das notinas em humanos são desconhecidos; sendo assim, torna-se interessante realizar o seu isolamento ou produção como proteína recombinante para que estudos quanto sua função no organismo humano seja averiguado e possível atividade no envenenamento seja identificado, tanto isoladamente quanto em condição de sinergismo.

REFERÊNCIAS

Abbott, W. M., Damschroder, M. M. & Lowe, D. C., 2014. Current approaches to fine mapping of antigen–antibody interactions. *Immunology*, 11 março, Volume 142, pp. 526-535.

Ahmad, Z. A. et al., 2012. scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical and development immunology*, Volume 98, pp. 1-16.

Alvarenga, L. M. et al., 2003. Production of monoclonal antibodies capable of neutralising dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. *Toxicon*, 5 setembro, Volume 42, pp. 725-731.

Alvarenga, L. M. et al., 2014. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins*, 21 Agosto, Volume 6, pp. 2541-2567.

Appel, M. H., da Silveira, R. B., Gremski, W. & Veiga, S. S., 2005. Insights into brown spider and loxoscelism. *Invertebrate survival journal*, pp. 152-158.

Becker-Finco, A. et al., 2013. Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. *Parasitology*, Março, 140(3), pp. 396-405.

Binford, G. J. et al., 2008. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Molecular phylogenetics and evolution*, Volume 49, pp. 538-553.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 29 Janeiro, pp. 248-254.

Bustillo, S. et al., 2012. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from *Bothrops alternatus* venom on skeletal muscle (C2C12) cells. *Toxicon*, 22 novembro, Volume 59, pp. 338-343.

Chaim, O. M. et al., 2011. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins: tools for biological purposes. *Toxins*, Volume 3, pp. 309-344.

Chaves-Moreira, D. et al., 2009. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1 julho, Volume 107, pp. 655-666.

Chaves-Moreira, D. et al., 2017. Highlights in the knowledge of brown spider toxins. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, Volume 23, pp. 1-12.

da Silva, P. H. et al., 2004. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, Volume 44, pp. 693-709.

da Silveira, R. B. et al., 2007a. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon*, Volume 49, pp. 758-768.

da Silveira, R. B. et al., 2007b. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom.. *The biochemical journal*, Volume 406, pp. 355-363.

Dasch, J. R. & Dash, A. L., 2014. Engineering antibodies. Em: *Antibodies: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold spring harbor press, p. 847.

de Castro, C. S. et al., 2004. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon*, Volume 44, pp. 273-280.

de Fernandes-Pedrosa, M. et al., 2002. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 298, pp. 638-645.

de Moura, J. et al., 2011. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine*, 26 agosto, Volume 29, pp. 7992-8001.

Dias-Lopes, C. et al., 2010. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. *Toxicon*, Volume 55, pp. 481-487.

Dias-Lopez, C. et al., 2014. Generation and molecular characterization of a monoclonal antibody reactive with conserved epitope in sphingomyelinases D from *Loxosceles* spider venoms. *Vaccine*, 22 fevereiro, Volume 32, pp. 2086-2092.

Duarte, C. G. et al., 2015. Anti-loxoscelic horse serum produced against a recombinant dermonecrotic protein of Brazilian *Loxosceles intermedia* spider neutralize lethal effects of *Loxosceles laeta* venom from Peru. *Toxicon*, pp. 37-40.

Fields, C. et al., 2013. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. *Nature Protocols*, 16 May, 8(6), pp. 1125-1148.

Filpula, D., 2007. Antibody engineering and modification technologies. *Biomolecular engineering*, Volume 24, pp. 201-215.

Fishman, J. B. & Berg, E. A., 2014. Antibody purification and storage. Em: E. A. Green, ed. *Antibodies: a laboratory manual*. 2 ed ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 847.

Frank, R., 2002. The SPOT-synthesis technique: synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications. *Journal of Immunological Methods*, Volume 267, pp. 13-26.

GE Healthcare, s.d. *Affinity Chromatography, Volume: Tagged Proteins*. s.l.:s.n.

Gomez-Cambronero, J., 2010. New concepts in PLD signaling in inflammation and cancer. *Scientific world journal*, Volume 10, pp. 1356-1369.

Gomez, H. F., Krywko, D. M. & Stoecker, W. V., 2002. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. *Annals of emergency medicine*, Volume 39.

Greenfield, E. A., 2014. Generating monoclonal antibodies. Em: *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 201-302.

Gremski, L. H. et al., 2010. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Molecular biosystems*, Volume 6, pp. 2403-2416.

Gremski, L. H. et al., 2014. Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. *Toxicon*, Volume 83, pp. 91-120.

Herzig, V. et al., 2011. ArachnoServer 2.0, an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic Acids Research*, Volume 39, pp. 653-657.

Jiacomini, I. et al., 2016. Immunodetection of the “brown” spider (*Loxosceles intermedia*) dermonecrotin with an scFv-alkaline phosphatase fusion protein. *Immunology letters*, Volume 173, pp. 1-6.

Juste, M., Muzard, J. & Billiald, P., 2006. Cloning of the antibody light chain V-gene from murine hybridomas by bypassing the aberrant MOPC21-derived transcript. *Analytical Biochemistry*, fevereiro, Volume 349, pp. 159-161.

Kalapothakis, E. et al., 2002. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon*, 29 junho, Volume 40, pp. 1691-1699.

Karim-Silva, S. et al., 2016. Generation of recombinant antibody fragments with toxin-neutralizing potential in loxoscelism. *Immunology letters*, Volume 176, pp. 90-96.

Kavran, J. M. & Leahy, D. J., 2015. Coupling antibody to cyanogen bromide-activated sepharose. *Methods Enzymology*, Volume 541, pp. 27-34.

Kohler, G. & Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells antibody of predefined specificity. *Nature*, Volume 256, pp. 1-3.

Kohl, T. O., 2014. Immunoassays. Em: E. A. Greenfield, ed. *Antibodies: a laboratory manual*. 2 ed ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 847.

Laffly, E. & Sodoyer, R., 2005. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. *Human antibodies*, Volume 14, pp. 33-55.

Laune, D. et al., 2002. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of immunological methods*, 267(1), pp. 53-70.

Laustsen, A. H. et al., 2016. Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development. *Toxins*, 23 Julho, Volume 8, p. 226.

Lebozec, K. et al., 2017. Design, development and characterization of ACT017, a humanized Fab that blocks platelet's glycoprotein VI function without causing bleeding risks. *MABS*, Volume 9, pp. 945-968.

Leckband, D., 2000. Measuring the forces that control protein interactions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, Volume 29, pp. 1-26.

Litovchick, L., 2014. Immunoblotting. Em: E. A. Greenfield, ed. *Antibodies: a laboratory manual*. 2 ed ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 847.

Lucas, S. M., 2015. The history of venomous spider identification, venom extraction methods and antivenom production: a long journey at Butantan Institute, São Paulo, Brazil. *Journal of venous animals and including tropical diseases*, Volume 21, pp. 1-3.

Machado, L. F. et al., 2005. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics*, Volume 5, pp. 2167-2176.

Madadlou, A., O'Sullivan, S. & Sheehan, D., 2017. Fast Protein Liquid Chromatography. Em: D. Walls & S. Loughran, eds. *Protein Chromatography: Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press.

Malaque, C. M. S. et al., 2011. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. *Toxicon*, Volume 58, pp. 664-671.

Marques-da-Silva, E. & Fischer, M. L., 2005. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Aranear, Sicaridae) no Estado do Paraná. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, Volume 38, pp. 331-335.

Matsubara, F. H. et al., 2017. Insectidal activity of a recombinant knottin peptide from *Loxosceles intermedia* venom and recognition of these peptides as a conserved family in the genus. *Insect molecular biology*, Volume 26, pp. 25-34.

Maynard, J. & Georgiou, G., 2000. Antibody engineering. *Annual review of biomedical engineering*, Volume 02, pp. 339-376.

Ministério da Saúde, 2001. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. 2nd ed. Brasília: FUNASA.

Mitsutake, S. & Igarashi, Y., 2007. Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 3, Volume 359, pp. 622-627.

Morais, M. S. d. S., Pereira, S. d. S., Stábeli, R. G. & Fernandes, C. F. C., 2014. Engenharia de anticorpos na busca por fragmentos funcionais para insumos de diagnóstico e aplicações terapêuticas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, pp. 633-642.

Muzard, J. et al., 2009. Grafting of protein L-binding activity onto recombinant antibody fragments. *Analytical Biochemistry*, 4 Março, Volume 388, pp. 331-338.

Nelson, A. L., 2010. Antibody fragments. *mAbs*, Volume 2, pp. 77-83.

Nicholson, G. M., 2006. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, Volume 49, pp. 490-512.

Ojeda, P. G. et al., 2018. Computational Studies of Snake Venom Toxins. *Toxins*, Volume 20, pp. 1-24.

Pauli, I. et al., 2009. Analysis of therapeutic benefits of antivenom at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom Brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon*, Volume 53, pp. 660-671.

Pauli, I., Puka, J., Gubert, I. C. & Minozzo, J. C., 2006. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon*, Volume 48, pp. 123-137.

Rodrigo, G., Gruvegard, M. & Van Alstine, J. M., 2015. Antibody fragments and their purification by protein L affinity chromatography. *Antibodies*, 11 setembro, Volume 4, pp. 259-277.

Ruppert, E. E., Fox, R. S. & Barnes, R. D., 2005. *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. 7th ed. São Paulo: Roca.

Sade, Y. B. et al., 2012. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *The international journal of biochemistry and cell biology*, Volume 44, pp. 170-177.

Sarantopoulos, S., 2014. Antibody production by the immune system. Em: *Antibodies: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold spring harbor press, p. 847.

Schroeder, H. W. & Cavacini, L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *The journal of allergy and clinical immunology*, Volume 125, pp. 41-52.

Sela-Culang, I., Kunik, V. & Ofran, Y., 2013. The structural basis of antibody-antigen. *Frontiers in Immunology*, Volume 4.

Silvestre, F. G. et al., 2005. Characterization of the venom from the Brazilian Brown Spider *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (Araneae, Sicariidae). *Toxicon*, 22 setembro, Volume 46, pp. 927-936.

SINANa, 2016. *Acidentes por animais peçonhentos - Brasil*. [Online] Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def> [Acesso em 28 janeiro 2018].

SINANb, 2016. *Acidente por animais peçonhentos - Paraná*. [Online] Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisPR.def> [Acesso em 28 janeiro 2018].

Spriestersbach, A. et al., 2014. Purification of His-tagged proteins. Em: *Methods in Enzymology*. Hilden, Germany: Elsevier Inc., p. 15.

Stoecker, W. V., Green, J. A. & Gomwz, H. F., 2006. Diagnosis of loxoscelism in a child confirmed with an enzyme-linked immunosorbent assay and noninvasive tissue sampling. *Journal of the american academy of dermatology*, Volume 55, pp. 888-890.

Stoecker, W. V. et al., 2009. Systemic loxoscelism confirmation by bite-site skin surface ELISA. *Missouri medicine*, Volume 106, pp. 425-431.

Swanson, D. L. & Vetter, R. S., 2006. Loxoscelism. *Clinics in dermatology*, Volume 24, pp. 213-221.

Tambourgi, D. V., Gonçalves-de-Andrade, R. M. & van den Berg, C. W., 2010. Loxoscelism: from basic research to the proposal of new therapies. Volume 56, pp. 1113-1119.

Todorovska, A. et al., 2001. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *Journal of immunological methods*, Volume 248, pp. 47-66.

Trevisan-Silva, D. et al., 2017. A multi-protease, multi-dissociation, bottom-up-to-top-down proteomic view of the *Loxosceles intermedia* venom. *Nature: Scientific Data*, 11 Julho, pp. 1-7.

University of Arizona, 2013. *Spider venom reveals new secret: Once injected into a bite wound, venom of brown recluse spider causes unexpected reaction*. [Online]

Available at: www.sciencedaily.com/releases/2013/08/130829214742.htm [Acesso em 28 janeiro 2018].

Utkin, Y. N., 2015. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, Volume 26, pp. 28-33.

Veiga, S. S. et al., 2000. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, Volume 38, pp. 825-839.

Winau, F. & Winau, R., 2002. Emil von Behring and serum therapy. *Microbes and Infection*, Volume 4, pp. 185-188.

WSC, 2018. *Natural History Museum Bern*. [Online]
Available at: <http://wsc.ch>
[Acesso em 27 janeiro 2018].

Young, C. L., Britton, Z. T. & Robinson, A. S., 2017. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 29 novembro, Volume 7, pp. 620-634.

Zahid, M. et al., 2011. Designand reshaping of an scFv directed against human platelet glycoprotein VI with diagnostic potential. *Analytical Biochemistry*, 2 Julho, Volume 417, pp. 274-282.